

Una guida per la scelta delle Tecnologie di “Static Light Scattering” per la GPC/SEC

Documenti di riferimento:

Malvern Panalytical Application Note

Lo scopo di questa guida è di fornire al lettore una chiara comprensione dei diversi approcci tecnologici usati per misurare il peso molecolare mediante il Light Scattering in un esperimento di GPC/SEC. Spiegheremo la differenza tra tecniche e tecnologie usate in SLS: MALS, RALS e LALS.

Non si presume che il lettore abbia già conoscenze sulla teoria del light scattering o sulla strumentazione, perciò questa guida è ideale per chi affronta la SLS per la prima volta ma anche per chi vuole approfondire le sue conoscenze.

La guida fornisce un'introduzione alla teoria ed alle misure di peso molecolare mediante Static Light Scattering. Speriamo che le informazioni qui contenute aiutino gli utilizzatori a prendere la giusta decisione circa la più appropriata tecnologia di light scattering da adottare per le proprie applicazioni.

Elenco dei contenuti

Introduzione

- Cos'è il peso molecolare?
- Cos'è la dimensione molecolare?
- Cos'è il Light Scattering?

Teoria dello Static Light Scattering

- Come il peso molecolare è correlato al light scattering
- Cos'è lo Static Light Scattering
- Static Light Scattering in GPC/SEC

Le diverse tecnologie di Light Scattering

- Una introduzione sulla dipendenza angolare
- Come la dipendenza angolare influenza i nostri calcoli?
- Come ottenere la dimensione delle molecole, R_g , dai dati?

Strumenti che utilizzano il light scattering

- Light scattering a 90° (RALS)
- Light scattering ad angoli bassi (LALS)
- Light scattering multiangolo (MALS)
- Sommario dei benefici dei 3 sistemi: MALS, LALS e RALS

Calibrazione

- Le misure di light scattering sono “assolute”?
- Principi per la calibrazione di uno strumento
- Calibrazione basata sugli standard di peso molecolare
- Calibrazione basata sugli standard di scattering

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

Sommario

La 'static light scattering' è una tecnica per misurare il peso molecolare sfruttando la relazione tra l'intensità della luce scatterata dalla molecola ed il suo peso molecolare e dimensione. Questa relazione è descritta dalla teoria di Rayleigh che stabilisce che il peso molecolare di una molecola è proporzionale al rapporto di Rayleigh della luce scatterata, cioè il rapporto dell'intensità della luce scatterata e l'intensità della luce incidente.

Tutti gli strumenti basati sulla static light scattering rivelano la quantità di luce scatterata dal campione per misurare il suo peso molecolare. All'aumentare della dimensione delle molecole però un secondo fattore chiamato dipendenza angolare diventa significativo. La dipendenza angolare influenza l'intensità della luce scatterata e quindi il peso molecolare calcolato. Occorre dunque tenerne conto.

- Un rivelatore RALS raccoglie la luce scatterata a 90°. Può misurare il peso molecolare con elevata sensibilità per campioni che scatterano la luce isotropicamente cioè ugualmente in tutte le direzioni, ma non può misurare il peso molecolare quando lo scattering è anisotropico cioè dipendente dall'angolo;
- Un rivelatore LALS raccoglie lo scattering a 7°. Può misurare il peso molecolare di tutte le molecole ma ha un basso rapporto segnale/rumore;
- Combinando RALS e LALS in un sistema ibrido, si può misurare il peso molecolare di tutti i campioni, massimizzando quando necessario il rapporto segnale/rumore. Sfrutta quindi i punti di forza di ambedue RALS e LALS senza i loro punti deboli;
- Un rivelatore MALS raccoglie lo scattering a vari angoli. Questi dati vengono utilizzati per creare un modello di dipendenza angolare di cui tener conto nel calcolo del peso molecolare. Consente la misura sia nel caso di scattering isotropico che anisotropo, e misura anche il raggio di girazione;
- Tutti gli strumenti basati sulla static light scattering devono essere calibrati. La calibrazione si può effettuare sia utilizzando degli standard di peso molecolare che degli standard di scattering; ciascuno dei due presenta vantaggi e svantaggi descritti nella "sezione calibrazione".

Glossario degli acronimi

GPC	Gel permeation chromatography
SEC	Size exclusion chromatography
LALS	Low angle light scattering
RALS	Right angle light scattering (90° light scattering)
MALS	Multi angle light scattering
SLS	Static light scattering
DLS	Dynamic light scattering
Rg	Radius of gyration
RH	Hydrodynamic radius
MW	Molecular weight (Molar Mass)
Mn	Number-average molecular weight
Mw	Weight-average molecular weight
Mz	Z-average molecular weight
A2	Second virial coefficient (B22)

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

Introduzione

'Light scattering' è un termine che può creare confusione. Numerose tecniche si basano sul light scattering e numerosi parametri diversi possono essere misurati. Alcuni strumenti usano più di una tecnica di light scattering e questo può far perdere di vista i parametri o fattori più importanti da considerare per scegliere la tecnologia light scattering più adatta alle proprie applicazioni.

La static light scattering, anche chiamata light scattering classica, è una tecnica utilizzata per misurare il peso molecolare e il raggio di girazione. Il termine Static Light Scattering viene associato a numerose tecnologie come SLS, MALS, LALS e RALS, etc.: ciascuna di queste ha delle sottili differenze e presenta vantaggi e svantaggi.

Questa guida descrive i principi e le teorie che sono dietro alla static light scattering: vengono confrontate teorie, tecniche e tecnologie per consentire al lettore di fare scelte informate. Ciascuna sezione fornisce molti dettagli, ma inizia elencando alcuni punti chiari per consentire di decidere se è opportuno leggere la sezione per intero.

Cos'è il peso molecolare

Punti chiave:

- Il peso molecolare è la massa molare delle molecole;
- Dalla distribuzione del peso molecolare si possono calcolare vari momenti quali M_n , M_w , M_z ;
- La polidispersità descrive la larghezza della distribuzione del peso molecolare.

Dettagli:

Il peso molecolare è una proprietà che descrive la massa di una singola molecola. Scientificamente è la massa di materiale necessaria per una mole di campione. Per esempio, il carbone ha un peso molecolare di 12g/mole. Le unità di peso molecolare sono in grammi per mole (g/mole), anche se spesso si utilizzano i Daltons (Da) o anche i kilo Daltons (kDa).

Per una proteina pura ci aspettiamo che il valore di peso molecolare sia fisso e uguale per tutte le molecole del campione. Per un campione di polimero sintetico o naturale, il peso molecolare delle molecole in un campione avrà una distribuzione che potrà avere varie forme. Il termine che descrive queste distribuzioni è la "polidispersità". Di un campione con una gamma ristretta di pesi molecolari si dirà che ha una bassa polidispersità, o che è monodisperso. Di un campione con un'ampia gamma di pesi molecolari si dirà che è altamente polidisperso.

La maggioranza dei campioni presenterà una gamma di pesi molecolari, in particolare i polimeri naturali o sintetici. Queste distribuzioni di pesi molecolari possono essere descritte in vari modi, ma un modo comune è l'utilizzo dei valori mediati di peso molecolare M_n , M_w e M_z , rispettivamente numero-mediato, peso-mediato e z-mediato. Sono valori definiti dalle equazioni sottostanti, dove C_i e M_i sono la concentrazione e il peso molecolare.

$$\overline{Mn} = \frac{\sum c_i}{\sum c_i / M_i} \quad \overline{Mw} = \frac{\sum M_i c_i}{\sum c_i} \quad \overline{Mz} = \frac{\sum M_i^2 c_i}{\sum M_i c_i}$$

Intuitivamente il peso molecolare mediato in numero Mn è la massa totale del materiale diviso per il numero totale di molecole e quindi corrisponde ad una media numerica. E' ponderato verso la massa più bassa delle molecole che sono le più numerose. Proprietà quali la diminuzione della pressione di vapore, la diminuzione del punto di gelo e della pressione osmotica dipendono dal numero di molecole e non dalla loro dimensione.

Per calcolare il peso molecolare Mw ponderato in peso si moltiplica per la massa delle molecole in modo che la media si sposti verso le molecole più grandi presenti nella distribuzione. Proprietà quali la diffusione, la sedimentazione, il light scattering dipendono sia dalla dimensione che dalla massa delle molecole.

Per calcolare il peso molecolare Mz si moltiplica ulteriormente con il peso molecolare delle molecole. Pertanto la media si sposta fortemente verso le molecole più grandi del campione, Mz può essere determinato direttamente tramite l'ultracentrifugazione.

Usando questi tre valori è possibile avere un'idea sull'intera distribuzione del peso molecolare. Tanto più questi valori sono vicini tra loro, tanto più bassa sarà la polidispersità; tanto più diversi saranno, maggiore sarà la polidispersità.

La polidispersità è definita dall'equazione: $Pd = Mw/Mn$

Poiché Mw è sempre uguale o maggiore di Mn, il valore più basso di polidispersità (Pd) è 1 mentre non c'è un limite teorico per valori superiori. Polimeri sintetici e naturali hanno un elevato valore di polidispersità. Le proteine hanno un valore fisso di peso molecolare quindi ci possiamo aspettare un valore di polidispersità molto basso (vicino a 1) per proteine ben definite (non aggregate).

Cos'è la dimensione molecolare?

Punti chiave:

- Il "Molecular Size" è la dimensione fisica delle molecole;
- Quando discutiamo di dimensione molecolare in static light scattering, parliamo di Rg, cioè del raggio di girazione;
- L'unità di misura della dimensione molecolare è il nanometro.

Dettagli:

Il "Molecular size" è la dimensione fisica di una molecola. Di solito si usa un solo valore per descriverla: questo valore è il raggio della sfera che ha una dimensione equivalente alla molecola che stiamo misurando. I due valori più usati di dimensione molecolare sono R_H (raggio idrodinamico) e R_g (raggio di girazione). Il raggio idrodinamico è il raggio di una sfera equivalente che diffonde alla stessa velocità della molecola che stiamo studiando. Viene calcolato dalla Dynamic Light Scattering (DLS) o dalla viscosità intrinseca, quindi non ce ne occuperemo in questa guida (per maggiori informazioni Vi rimandiamo alle Note Tecniche "Dynamic Light Scattering; an introduction in 30 minutes" e "Protein and polymer molecular size by GPC/SEC").

Applicazione
 Polimeri
 Biomolecole
 Tecnica
 GPC/SEC
 Peso Molecolare

Il raggio di girazione è un'espressione matematica della distribuzione delle masse all'interno della molecola. Corrisponde alla radice quadrata della media delle distanze al quadrato, dal centro di massa alle varie masse della molecola. L'unità di misura del raggio di girazione R_g è il nanometro (nm). R_g viene calcolato utilizzando la static light scattering, questo sarà trattato nel dettaglio più avanti.

Cos'è il light scattering?

Punto chiave:

- Quando la luce colpisce una molecola o una particella, in parte viene assorbita e in parte viene riemessa in tutte le direzioni.

Dettagli:

Quando un fotone collide con una molecola, una parte dell'energia del fotone viene utilizzata per generare ciò che è chiamato un dipolo oscillante nella molecola. Quest'energia successivamente viene riemessa dalla molecola in tutte le direzioni sotto forma di luce. Questo fenomeno lo possiamo osservare ogni giorno nelle bianche nuvole, al tramonto o quando la polvere attraversa un raggio di luce. I principi che sono alla base del light scattering possono essere sfruttati per misurare molte proprietà delle molecole.

La Teoria dello static light scattering

Come il peso molecolare è correlato allo scattering della luce?

Punto chiave:

- La teoria di Rayleigh descrive la relazione tra intensità della luce scatterata da una campione e il suo peso e la sua dimensione molecolare.

Dettagli:

Le proprietà della luce scatterata da molecole e particelle varie dipendono dall'oggetto che genera lo scattering, come descritto nell'equazione di Rayleigh:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) \frac{1}{P_\theta}$$

Dove:

- C = concentrazione del campione
- Θ = angolo di misura
- R_θ = Rapporto di Rayleigh (rapporto tra intensità della luce scatterata e intensità della luce incidente) all'angolo di misura Θ
- M_w = Peso molecolare mediato in peso
- A_2 = Secondo coefficiente viriale

K e P_{θ} sono termini più complessi così definiti:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2$$

Dove:

- λ_0 = lunghezza d'onda del laser nel vuoto
- N_A = numero di Avogadro
- n_0 = indice di rifrazione del solvente
- dn/dc = incremento dell'indice di rifrazione del campione

$$\frac{1}{P_{\theta}} = 1 + \frac{16\pi^2 n_0^2 R_g^2}{3\lambda_0^2} \text{Sin}^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Dove:

- R_g = raggio di girazione della molecola

In termini semplici, l'equazione di Rayleigh ci dice che l'intensità della luce scattata a un determinato angolo dipende da molti fattori tra cui peso molecolare e dimensione molecolare del campione esaminato.

Come si vede dall'equazione, le molecole con peso molecolare e dimensione maggiore generano maggiore scattering. L'incremento dell'intensità dello scattering è lineare con il peso molecolare, non lo è invece rispetto alla dimensione.

Dunque, conoscendo tutti gli altri fattori nell'equazione di Rayleigh, possiamo misurare l'intensità dello scattering (corredato di R_{θ}) e calcolare il peso molecolare del campione.

Cos'è la static light scattering (SLS)?

Punto chiave:

- E' la tecnica di light scattering che usiamo per misurare il peso molecolare

Dettagli:

La Static Light Scattering (SLS) usa un arrangiamento ottico tale che il segnale rilevato è statico o stabile. Misurando l'intensità della luce scattata da un campione mentre le altre costanti sono note, si può calcolare il peso molecolare.

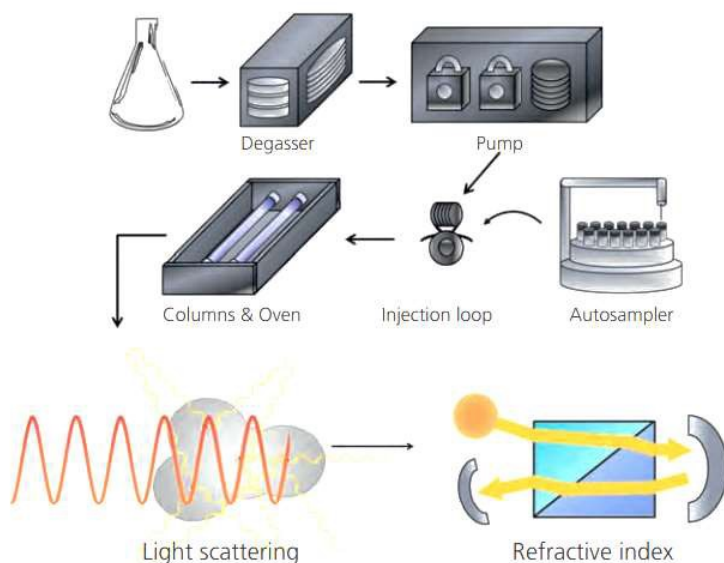
Il termine 'Static' Light Scattering (SLS) è usato per differenziare la tecnica dalla 'Dynamic' Light Scattering (DLS), tecnica diversa utilizzata per misurare la dimensione delle particelle (particle size). Per maggiori informazioni sulla DLS vedere la Nota Tecnica "Dynamic Light Scattering: an introduction in 30 minutes", oppure "A basic guide to particle characterization" nel sito Malvern.

Static light scattering in GPC/SEC

Punto chiave:

- Le misure SLS sono comunemente eseguite grazie a sistemi GPC/SEC ma si possono anche eseguire in cuvetta;
- Per eseguire misure SLS è necessario un rivelatore di concentrazione, tipicamente un detector d'indice di rifrazione RI ma può essere anche un detector UV .

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare



Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

Figura 1: Schema di un sistema GPC/SEC. Il degassatore, la pompa, il loop d'iniezione, e le colonne sono standard mentre il campionatore automatico è opzionale. Dopo separazione, le molecole sono misurate da uno o più detector posizionati in sequenza, in questo caso un detector light scattering seguito da un detector d'indice di rifrazione.

Le diverse tecnologie di light scattering

Un'introduzione alla dipendenza angolare

Punti chiave:

- Per elevate dimensioni molecolari, l'intensità della luce scatterata dalle molecole comincia a variare con l'angolo di misura e dovremo tenere conto di questo fenomeno. Questa è la dipendenza angolare;
- Uno scattering isotropico è generato da piccole molecole ($R_g < 15\text{nm}$) che presentano una dipendenza angolare nulla o trascurabile;
- Uno scattering anisotropo è generato da molecole grandi ($R_g > 15\text{nm}$) per le quali l'intensità scatterata varia con l'angolo di misura;
- Per una misura accurata di peso molecolare dobbiamo tenere in considerazione quanto sopra, ed è ciò che i diversi strumenti fanno in vario modo;
- Se si tiene conto della dipendenza angolare misurandola (MALS), i dati possono essere utilizzati per calcolare il raggio di girazione R_g .

Dettagli:

L'equazione di Rayleigh mostrata prima comprende il termine $1/P_e$ del quale assumevamo di conoscere il valore. Ciò in realtà non era vero ed è qui che entrano in gioco le differenze tra i diversi strumenti di light scattering.

P_e , o fattore di forma, è legato alla dimensione della molecola e all'angolo al quale si misura lo scattering. Si definisce nel modo seguente:

$$\frac{1}{P_{\theta}} = 1 + \frac{16\pi^2 n_0^2 R_g^2}{3\lambda_0^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

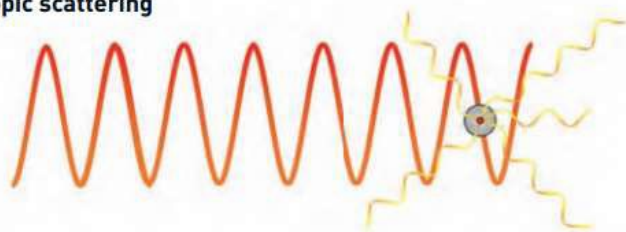
Dove:

- n_0 = indice di rifrazione del solvente
- R_g = raggio di girazione delle molecole
- λ_0 = lunghezza d'onda del laser nel vuoto
- θ = angolo di misura

Si vede dunque che $1/P_{\theta}$ è dipendente da svariati fattori connessi sia con il campione che con la misura. Questi comprendono l'indice di rifrazione del solvente n_0 , la lunghezza d'onda del laser nel vuoto λ_0 , l'angolo di misura θ e la dimensione delle molecole che stiamo misurando R_g .

Ciò significa che con l'aumentare della dimensione delle molecole, la quantità di luce scatterata dipenderà dall'angolo di misura. Questo fenomeno è chiamato 'dipendenza angolare dello scattering' proviene dal fatto che con l'aumentare della dimensione molecolare i fotoni non sono più scatterati in modo indipendente ma interferiscono tra loro (fig. 2).

A: Isotropic scattering



B: Anisotropic scattering

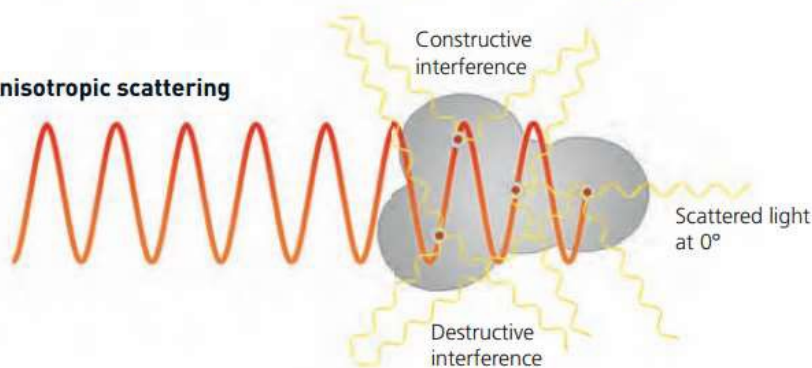


Figura 2: A. Lo scattering è isotropico quando la dimensione molecolare è piccola rispetto alla lunghezza d'onda della luce incidente, lo scattering è identico in tutte le direzioni. B. Lo scattering è anisotropico quando la dimensione molecolare è grande rispetto alla lunghezza d'onda, la luce è scatterata in varie direzioni con varie intensità.

Quando la molecola è piccola rispetto alla lunghezza d'onda del laser nel vuoto λ_0 , come nella figura 2, agisce come un punto di scattering e la luce viene scatterata allo stesso modo in tutte le direzioni. Sono molecole scatteranti in modo isotropico.

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

Quando le molecole aumentano di dimensioni rispetto a λ_0 , la dimensione e la struttura cominciano a diventare importanti. Ciascun fotone che proviene dal laser, viene scaterato da punti diversi della molecola. Ciò dipende dal raggio di girazione R_g . I fotoni scaterati variano in fase e quindi interferiscono fra di loro: la risultante intensità misurata dipenderà dalla posizione di osservazione. Queste molecole producono scattering anisotropo. Alle dimensioni che ci interessano, tutte le interferenze sono distruttive: ciò significa che l'intensità risulterà sempre inferiore ad uno scattering isotropico. Se utilizzassimo questa intensità per calcolare il peso molecolare, utilizzando l'equazione di Rayleigh, sarebbe sottostimato.

Per eliminare quest'effetto l'equazione di Rayleigh ci dice che se siamo capaci di fare le misure di intensità ad angolo $\theta = 0^\circ$, allora il $\text{Sin}^2(\theta/2)$ sarà 0 e $1/P\theta$ sarà 1. Quindi a 0° , l'intensità di scattering non è più influenzata da interferenze e si può correlare l'intensità al peso molecolare così come si fa per le molecole più piccole, misurandole a 90° . Sfortunatamente, è impossibile misurare l'intensità scaterata a 0° perché a quest'angolo l'intensità del laser è talmente più forte della luce scaterata che non è possibile separare e misurare la luce puramente scaterata. Non potendo misurare direttamente a 0° , dobbiamo trovare tecniche alternative.

La regola arbitraria utilizzata per decidere dove comincia la dipendenza angolare dice che quando il diametro è inferiore a $1/20$ della lunghezza d'onda del laser, le molecole scaterano in modo isotropico mentre quando il diametro è superiore allora lo scattering è anisotropo. La gran parte degli strumenti usano un laser con lunghezza d'onda λ compresa tra 633 e 670 nm (rosso) quindi il limite per lo scattering isotropico si manifesta per le molecole con raggio tra 15.8 e 16.8 nm. Per un laser di lunghezza d'onda λ 532 nm (verdi) il limite scende a 13 nm. Questo valore nominale intorno a 15nm di raggio come limite per la misura della dipendenza angolare diventa anche il limite inferiore al quale si possono ancora fare misure affidabili di dimensione molecolare, ovvero di raggio di girazione R_g (vedere più avanti "Come ottenere la dimensione molecolare R_g dai dati").

I vari strumenti sono progettati per superare il problema della dipendenza angolare, lo fanno in vari modi come descritto nella sezione che segue.

Come la dipendenza angolare influenza i nostri calcoli

Punti chiave:

- Dobbiamo dedurre lo scattering a 0° basandoci sullo scattering ad altri angoli;
- Questo si può fare usando uno Zimm plot $KC/R\theta$ vs. $\text{Sin}^2(\theta/2)$
- Anche la dimensione molecolare R_g può essere determinata dallo Zimm plot.

Dettagli:

Per superare la dipendenza angolare, dobbiamo decidere quale è l'intensità della luce scatterata a 0° basandosi sui dati ad altri angoli. Il modo migliore di calcolare e rappresentare questo è il "Guinier Plot", cioè una semplificazione dello Zimm plot dove il secondo coefficiente viriale non è richiesto.

Un "Guinier Plot" è un grafico di KC/R_θ in funzione dell'angolo $[\sin^2(\theta/2)]$. Sono disponibili altri grafici e modelli, ma il "Guinier Plot" è il più comune. Un esempio è mostrato nella figura 3.

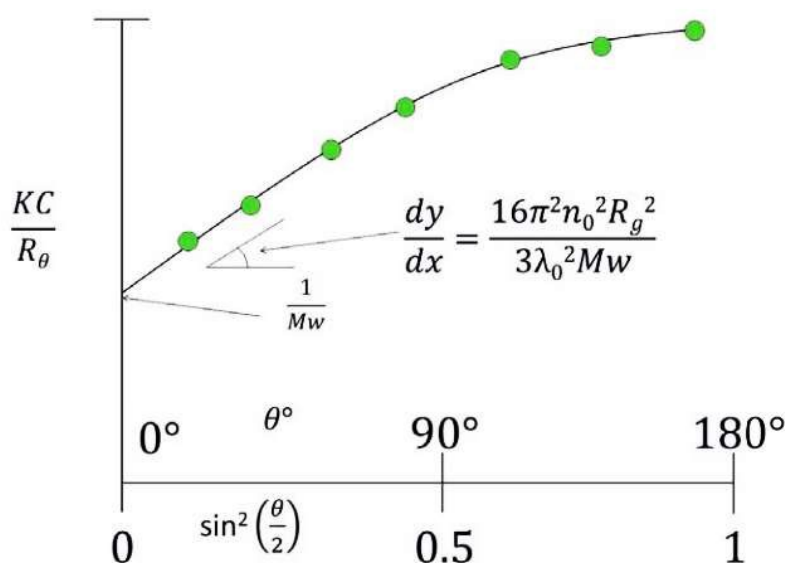


Fig. 3 : Un Guinier Plot descrive KC/R_θ in funzione di $\sin^2(\theta/2)$. L'intercetto della curva con le ordinate corrisponde a $1/Mw$ e la pendenza iniziale è correlata a R_g .

Le misure d'intensità di light scattering sono fatte all'angolo desiderato. Conoscendo la concentrazione del campione ed altri fattori si può calcolare KC/R_θ , e costruire il grafico in funzione di $\sin^2(\theta/2)$. L'intercetto con l'asse delle Y (che equivale all'angolo 0°) corrisponde a $1/Mw$ dal quale si ottiene il peso molecolare.

Come otteniamo la dimensione molecolare, R_g , dei dati?

Punti chiave:

- La dimensione molecolare R_g può essere determinata dalla pendenza iniziale del grafico della dipendenza angolare;
- Ci deve essere una dipendenza angolare sufficiente per misurare la pendenza escludendo il rumore

Dettagli:

La pendenza iniziale della linea è:

$$\frac{dy}{dx} = \frac{16\pi^2 n_0^2 R_g^2}{3\lambda_0^2 Mw}$$

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

R_g si calcola da questa equazione abbastanza facilmente. Per molecole piccole, la pendenza sarà piccola e nascosta nel rumore di fondo.

Solo quando le molecole raggiungono una dimensione apprezzabile in confronto alla lunghezza d'onda λ del laser la pendenza risulta abbastanza grande per ottenere un valore affidabile di R_g . Come sopraddetto, la soglia nominale nel caso di un laser da 633 nm è un R_g di 15nm.

Naturalmente il limite assoluto per poter misurare R_g può variare rispetto al valore nominale di 15 nm in funzione del campione, del solvente e delle condizioni di misura.

Molti fabbricanti di strumenti MALS indicano un limite di 10 nm (o perfino inferiore) nelle specifiche dei loro strumenti. Ciò è spesso valido solo per polimeri standard con elevato valore di dn/dc ad elevate concentrazioni se analizzati in condizioni ideali. Nella pratica questi limiti non sono raggiungibili per tutti i campioni. All'altro estremo, nel caso di campioni con scarso dn/dc ed in condizioni d'analisi non ideali il valore più piccolo di R_g misurabile può essere molto più elevato dei 15nm di valore nominale.

Strumenti light scattering

Ci sono 4 diversi tipi di strumenti SLS : RALS, LALS, Hybrid RALS/LALS e MALS .

Right Angle light scattering (RALS)

Punti chiave:

- Misura solo a 90°
- Ha il miglior rapporto segnale/rumore e sensibilità
- Ha la cella a flusso più piccola
- Può misurare accuratamente il peso molecolare solo per molecole con $R_g < 15$ nm
- È eccellente per la misura del peso molecolare di proteine
- Non misurano l' R_g

Dettagli:

Il detector RALS è lo strumento light scattering più semplice. Misura l'intensità della luce scatterata a 90° rispetto alla luce incidente (fig.

4A) . Il peso molecolare del campione viene calcolato dall'intensità misurata e dalla concentrazione del campione. Nello Zimm plot della fig. 4B l'intensità della luce scatterata viene misurata lontano dall'asse Y e si assume che lo scattering del campione sia isotropico (uguale a tutti gli angoli).

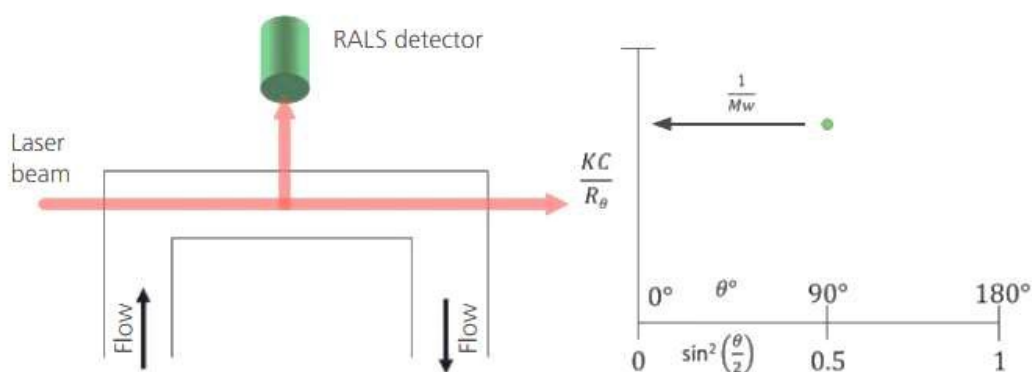


Fig. 4A: Schema di un detector RALS schematizzando il flusso attraverso la cella. La luce entra nella cella e viene rilevata a 90°.

Fig. 4B: Con un detector RALS il Debye Plot è ridotto ad un singolo punto che si presume uguale ad ogni angolo e quindi uguale a $1/Mw$.

Un detector RALS ha molti vantaggi:

- E' uno strumento facile da costruire senza ottiche complicate. Richiede solo una cella a flusso di piccolo volume con una finestra a 90°;
- Poiché la luce attraversa l'interfaccia finestra/liquido con un angolo di 90°, qualunque fenomeno di flare o rumore generato dal cambio nell'indice di rifrazione viene minimizzato;
- Di conseguenza un detector RALS è il più semplice dei detector SLS e grazie al suo basso rumore, ha il miglior rapporto segnale/rumore e quindi la migliore sensibilità.

Un detector RALS ha comunque alcuni limiti

- La misura ad un angolo solo, cioè a 90° assume che l'intensità dello scattering sia la stessa a 90° e a 0°. Ciò però non è vero per le molecole abbastanza grandi che mostrano una dipendenza angolare. Quindi il rivelatore RALS non può eseguire una misura accurata per molecole con R_g 15 nm come già discusso.
- Poiché la misura è fatta ad un solo angolo, non si può calcolare la pendenza della curva nello Zimm Plot e quindi non è possibile calcolare R_g .
- Avendo quasi tutte le proteine un raggio inferiore ai 15nm e quindi uno scattering debole, necessitano di un detector molto sensibile. Il rivelatore RALS è quindi ideale per misurare il peso molecolare di proteine.

Low Angle Light Scattering (LASLS)

Punti chiave:

- Misura al più basso angolo possibile
- Misurare il peso molecolare di tutte le molecole con la maggiore accuratezza
- Utilizzare una cella a flusso di piccolo volume
- Non può misurare il raggio di girazione R_g

Dettagli:

Un rivelatore LALS misura l'intensità dello scattering ad un angolo più vicino possibile a 0°, come dettagliato nella figura 5A.

Ciò ha il vantaggio che l'intensità sarà molto simile a quella a 0° e il peso molecolare calcolato sarà molto vicino al valore reale. Per essere considerato un rivelatore LALS, l'angolo deve essere inferiore a 10°; i più comuni misurano a 7°, comunque più l'angolo si avvicina a 0° e più accurata sarà la misura. Ciò sarà vero indipendentemente dalla dimensione delle molecole. Osservando lo Zimm plot (fig. 5B), si nota che una misura LALS è molto vicina all'asse Y, e quindi molto vicina all'intersezione. Con l'angolo di misura a 7°, $\sin^2(\theta/2)$ vale 0.0037 che equivale circa a 1% di errore sul peso molecolare M_w anche per molecole grandi.

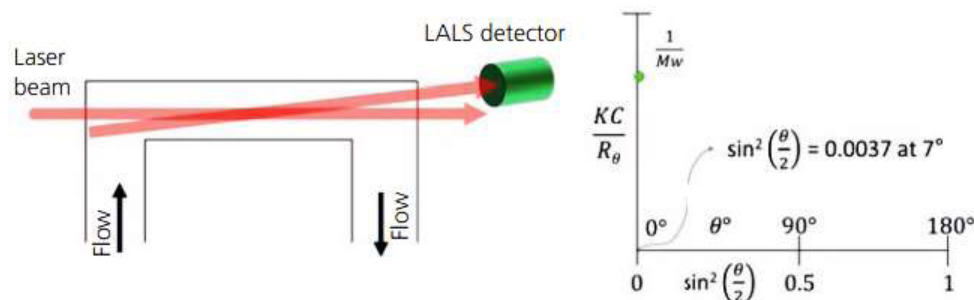


Fig. 5A: Schema di un detector LALS mostrando il flusso attraverso la cella. La luce entra nella cella e viene rilevata attraverso la stessa finestra ad angolo basso, ad esempio 7°.

Fig. 5B: Con un detector LALS il Debye Plot è ridotto ad un singolo punto molto vicino all'asse Y e quindi uguale a $1/M_w$ per tutte le molecole.

Un detector LALS ha molti vantaggi:

- Misura lo scattering molto vicino all'asse Y dello Zimm Plot quindi il peso molecolare calcolato M_w ha la massima accuratezza;
- Il principio è valido per la misura del peso molecolare di qualunque molecola;
- La cella a flusso di un detector LALS può essere di piccolo volume perché la misura viene effettuata ad un solo angolo.

Un detector LALS ha comunque vari limiti:

- Misurando ad un solo angolo un detector LALS non può misurare R_g
- Un detector LALS non ha esattamente la sensibilità di detector RALS, ed è meno sensibile quando il campione ha uno scattering debole; ciò non rappresenta un problema perché il LALS viene usato di solito per molecole più grandi;
- Le difficoltà costruttive per un sistema LALS sono maggiori, perché luce incidente e luce scatterata sono molto vicine, la luce scatterata dovendo essere raccolta senza raccogliere anche la luce del laser. Inoltre il rivelatore LALS è sensibile alla contaminazione perché le particelle contaminanti di solito sono grandi e scatteranno la luce soprattutto frontalmente. Per quanto sopra i primi rivelatori LALS erano molto rumorosi e difficili da operare. Lo stesso vale per i bassi angoli dei rivelatori MALS. Invece, gli strumenti LALS moderni dedicati sono capaci di isolare la luce scatterata da quella incidente e quindi di minimizzare il rumore e migliorare nettamente la sensibilità.

Applicazione

Polimeri

Biomolecole

Tecnica

GPC/SEC

Peso Molecolare

In conclusione i detector LALS offrono un modo accurato di misurare il peso molecolare con la tecnica Static Light Scattering. I detector LALS sono particolarmente utili per la misura del peso molecolare di campioni a scattering anisotropo come i polimeri naturali e sintetici.

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

Detector Ibridi RALS/LALS

Punti chiave:

- Combinano i due rivelatori RALS e LALS in un'unica unità
- Usa il RALS per massimizzare la sensibilità nei casi di scattering debole
- Usa il LALS per massimizzare l'accuratezza nei casi di scattering anisotropo
- Mantiene la cella a flusso di piccolo volume dei detectors RALS e LALS
- Consente una stima del raggio di girazione R_g

Dettagli:

E' chiaro da quanto detto prima che RALS e LALS sono rivelatori complementari. Uno ha la sensibilità per misurare scattering isotropico debole e l'altro permette la misura del peso molecolare di molecole grandi con un'ineguagliabile accuratezza.

Un sistema ibrido RALS/LALS combina quindi sulla stessa cella le due misure come schematizzato nella figura 6A. Sullo Zimm Plot, il detector RALS viene usato per misurare molecole la cui dimensione è inferiore a 15nm, limite per lo scattering isotropico. Il detector LALS viene usato per molecole con dimensione maggiore al limite di 15 nm dello scattering isotropico. Il software commuta automaticamente da LALS a RALS secondo il segnale del rivelatore. Per campioni con scattering anisotropo, il rapporto tra i due pesi molecolari calcolati può essere usato per stimare $P\theta$. Questo a sua volta può essere usato per stimare un valore di R_g assumendo un modello strutturale quale "random coil" o sfera rigida.

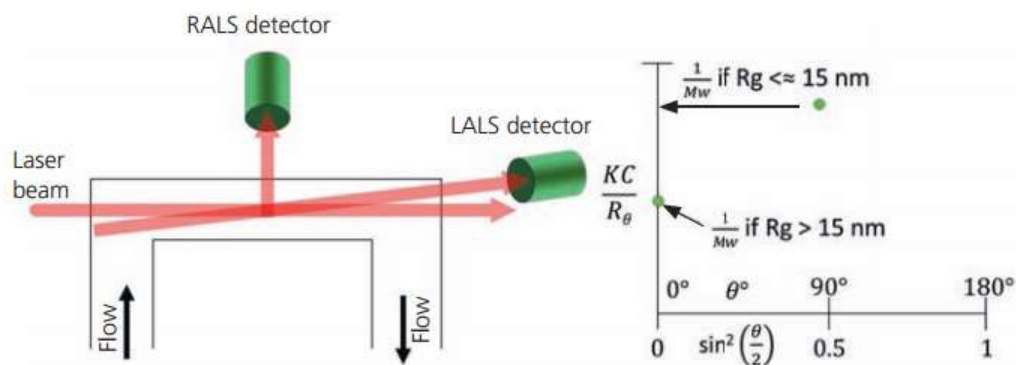


Fig. 6A: Schema di un detector ibrido RALS/LALS mostrando il flusso attraverso la cella. La luce entra nella cella e viene rilevata a 90° ed attraverso la stessa finestra ad angolo basso, ad esempio 7°.

Fig. 6B: Con un detector ibrido RALS/LALS il Debye Plot è ridotto a due punti dove il RALS viene usato per massimizzare la sensibilità per campioni a scattering isotropico, mentre il valore LALS viene usato per il calcolo più accurato del M_w per campioni a scattering anisotropico.

Detector Ibridi RALS/LALS

La combinazione RALS/LALS offre i vantaggi di ambedue i detectors

- Il detector RALS offre la migliore sensibilità per le molecole più piccole
- Il detector LALS offre la migliore sensibilità per le molecole più grandi
- I due angoli possono essere confrontati simultaneamente dal software per produrre i migliori dati in ciascun punto del cromatogramma
- Un detector ibrido RALS/LALS mantiene la cella a flusso di piccolo volume tipica dei detectors RALS e LALS
- Combinando i dati dei due angoli è possibile misurare la pendenza della curva Zimm Plot ed calcolare una buona stima di R_g .

Le limitazioni del detector ibrido RALS/LALS includono:

- I dati LALS possono essere rumorosi se il sistema GPC/SEC non è pulito
- L' R_g calcolato ha un'accuratezza limitata

In conclusione, un detector ibrido RALS/LALS offre i vantaggi di entrambi i detector senza i loro limiti. Questo fa del detector ibrido RALS/LALS un sistema eccellente per misurare il peso molecolare di qualunque campione.

Multi-angle light scattering (MALS)

Punti chiave:

- Misura l'intensità della luce scatterata a vari angoli ed estrapola l'intensità a 0°
- Misure a diversi angoli possono dare maggiore fiducia nel dato ottenuto
- Alcuni angoli si possono eliminare se utile
- Misura il peso molecolare di molecole di ogni dimensione
- Misura il raggio idrodinamico R_g di molecole $\approx 15\text{nm}$
- E' difficile selezionare il modello migliore di analisi.
- Il design della parte ottica obbliga all'uso di cella a flusso di maggior volume
- La complessità dell'ottica può introdurre rumore e diminuire l'accuratezza
- La complessità dell'ottica aumenta il costo del detector

Dettagli:

Come si vede dalla figura 7A, un detector MALS misura l'intensità della luce scatterata a vari angoli. Posizionando questi punti sullo Zimm Plot (figura 7B) ed estrapolando la curva a 0° si ottiene il valore da cui calcolare il peso molecolare. La pendenza iniziale di questa curva permette la misura accurata della dimensione molecolare R_g .

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

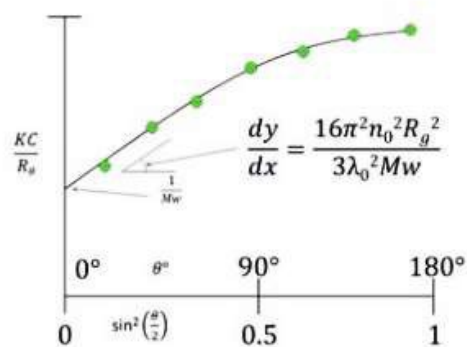
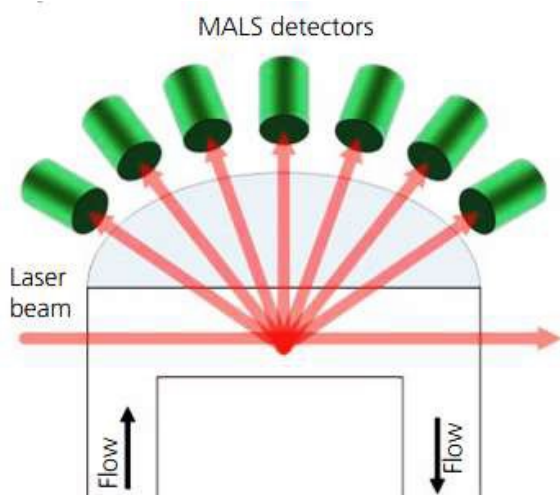


Fig. 7A: Schema di un detector MALS mostrando il flusso attraverso la cella. La luce entra nella cella e la luce scatterata esce a diversi angoli. Viene rilevata dai diversi detectors.

Fig. 7B: Con un detector MALS il Debye Plot è completo e viene estrapolato a 0°. Il peso molecolare Mw è calcolato dall'intercetto e il raggio di girazione Rg è calcolato dalla pendenza iniziale della curva.

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

Un detector MALS presenta numerosi vantaggi propri:

- Misurando l'intensità a vari angoli, l'utilizzatore può essere più confidente sul risultato ad un dato angolo confrontando i valori degli angoli vicini
- Con un detector MALS si può misurare il peso molecolare di molecole di ogni dimensione poiché la dipendenza angolare viene sempre tenuta in conto.
- Misurando a vari angoli si può misurare il raggio di girazione Rg con accuratezza
- Lo studio della forma dello Zimm Plot offre una maggiore comprensione della dipendenza angolare della luce scatterata
- Se la misura a qualche angolo fallisce o raccoglie troppo rumore, si può escludere l'angolo senza danno sui risultati

Anche un detector MALS ha dei limiti:

- Poiché la forma e la struttura della molecola sono sconosciuti, è difficile individuare quale modello e fitting di estrapolazione darà la misura corretta
- Per incorporare più angoli, la cella di un detector MALS deve avere un volume maggiore e ciò genera un allargamento dei picchi (peak broadening)
- La complessità della cella fa sì che gli angoli più bassi sono spesso più rumorosi delle misure con i detector RALS e LALS, e quindi ciò diminuisce l'accuratezza della misura.
- Nelle misure MALS, l'assenza di informazioni dettagliate sulla forma e struttura delle molecole adduce maggiore difficoltà nella scelta di un modello idoneo per l'estrapolazione. Un fitting accurato essendo particolarmente dipendente dal numero di bassi angoli e dall'accuratezza dei punti, l'importante per un detector MALS è avere il numero massimo di bassi angoli per avere la massima accuratezza nell'estrapolazione a 0°. In generale, avere più angoli massimizza l'accuratezza dell'estrapolazione.

Per riassumere, il detector MALS offre una soluzione universale per le misure di peso molecolare e raggio di girazione per tutti i tipi di campioni, ma ragioni strumentali obbligano a qualche compromesso nelle misure.

Sommario dei benefici dei sistemi MALS, LALS E RALS

LALS è la tecnica migliore per misure accurate di peso molecolare di molecole grandi (R_g 10-15nm) perché minimizza l'effetto della dipendenza angolare dello scattering ed elimina la necessità dell'estrapolazione.

Le piccole molecole scatterano isotropicamente quindi non c'è dipendenza angolare. In questa situazione una singola misura a 90° (RALS) offre la misura più sensibile ed accurata per queste molecole che hanno uno scattering debole. Ciò include quasi tutte le proteine.

Il MALS misura il peso molecolare delle molecole di ogni dimensione.

Il MALS offre una maggiore comprensione della dipendenza angolare dello scattering per le molecole grandi (raggio > 10-15 nm) consentendo la più alta qualità e la maggior accuratezza nelle misure di R_g , confrontate con il sistema ibrido RALS/LALS. R_g può essere utilizzato per caratterizzare la struttura di queste molecole grandi.

Calibrazione

Le misure di static light scattering (SLS) sono assolute?

Le tecniche di light scattering sono spesso chiamate "assolute" ma questa è spesso una incomprensione.

- L'aggiunta di un rivelatore light scattering ad un sistema SEC ci libera di tutte le forme di calibrazione della colonna e ci permette la misura del peso molecolare (MW) del campione senza dover creare una curva di calibrazione. Per questo chiamiamo spesso la tecnica "assoluta".
- Da un punto di vista fondamentale, la teoria descritta precedentemente si basa su principi primari senza assunzioni, per questo motivo viene spesso descritta come una tecnica 'assoluta'. Ciononostante, ad un certo punto del processo, dobbiamo comunque correlare l'intensità del segnale di un fotodetector (i.e. l'intensità della luce scatterata) al peso molecolare della molecola responsabile dello scattering. Questo richiederà sempre una certa calibrazione dello strumento o la generazione di fattori di risposta, etc. e quindi la tecnica non può essere realmente 'assoluta'.

Principio di calibrazione dello strumento

Sebbene la colonna non richieda calibrazione, tutti gli strumenti per light scattering richiedono una forma di calibrazione. La questione è come va calibrato il sistema, le modalità possono essere molte.

Il principio della calibrazione di un sistema light scattering, come tutte le calibrazioni, consiste nel fare riferire il livello del segnale di risposta al parametro misurato. In Static Light Scattering mettiamo in relazione l'intensità del segnale del fotodetector con l'intensità della luce scatterata e poi con il peso molecolare del campione.

Applicazione

Polimeri

Biomolecole

Tecnica

GPC/SEC

Peso Molecolare

Nello stesso modo in cui vari fattori dell'equazione di Rayleigh dipendono dal campione, l'intensità misurata della luce scatterata dipenderà da un gran numero di variabili strumentali, tra cui:

- Potenza del laser incidente
- Sensibilità del detector
- Volume di scattering (volume dell'intersezione del raggio laser e dell'ottica di rivelazione)
- Distanza tra il volume di scattering e il rivelatore
- Flare (bagliore) ed effetto di rifrazione all'interfaccia tra la cella e le finestre

Siccome non è possibile misurare in modo diretto e sufficientemente accurato questi parametri, essi verranno invece tutti considerati nella fase di calibrazione.

Esistono due metodi per calibrare un sistema ma tecnicamente sono identici (dettagliati in seguito).

Calibrazione basata su standard di peso molecolare

Punti chiave:

- L'uso di uno standard di peso molecolare consente la calibrazione di tutti i detector di light scattering allo stesso tempo
- In questo modo, la calibrazione viene effettuata nelle condizioni della misura
- Questo metodo permette anche il calcolo simultaneo di costanti di calibrazione per altri detector, dei volumi inter-detector e di correzioni dell'allargamento dei picchi (peak broadening)
- Questo metodo consente il controllo e la ripetizione della calibrazione in ogni momento.

Dettagli:

Il principio della calibrazione basata su standard di peso molecolare è di far passare un campione di peso molecolare conosciuto nel detector SLS quando è collegato ad un sistema GPC/SEC.

L'intensità della risposta del detector di light scattering e la concentrazione, il peso molecolare e il dn/dc del campione sono noti e utilizzati per calcolare il fattore di risposta dello strumento ovvero la costante di calibrazione per il detector di light scattering.

Trascurando valori quale indice di rifrazione del solvente e lunghezza d'onda del laser, la costante di calibrazione è definita come:

$$k_{ls} = \frac{\delta LS_{std}}{Mw_{std} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)_{std}^2 \cdot mass_{std}}$$

Dove:

- M_w = peso molecolare del campione
- δLS = Intensità di scattering misurata per il campione
- dn/dc = Incremento d'indice di rifrazione del campione
- $Mass$ = Massa di campione iniettato
- kls = Costante di calibrazione light scattering

In un sistema GPC/SEC con multipli detector, questi possono essere calibrati tutti allo stesso tempo usando un opportuno standard ben caratterizzato e certificato. Un ulteriore beneficio di questa calibrazione è che si può tenere in conto allo stesso tempo dei volumi interdetector tra le celle dei vari detectors, dell'allargamento dei picchi o "peak-broadening" generato per effetto del viaggio del campione nei vari detectors.

Ulteriore beneficio del metodo è la possibilità per l'utilizzatore di controllare e ricalibrare in ogni momento. Ciò è particolarmente utile perché la costante varia nel tempo per effetto della degradazione della sorgente di luce, la pulizia della cella a flusso, il cambio dei tubi dei rivelatori, etc.

Una calibrazione basata su standard di peso molecolare consente di definire tutti i fattori di risposta dello strumento i.e. tutte le costanti di calibrazione allo stesso tempo calcolando tutti i volumi inter-detector e parametri di peak broadening. Offre il modo più accurato di calibrare un sistema e anche la possibilità di valutare la calibrazione del sistema ad ogni momento paragonando la risposta dello standard alla risposta ottenuta al momento della calibrazione. Si tratta dunque di un metodo di calibrazione molto efficace.

Calibrazione con uno standard di scattering

Punti chiave:

- La calibrazione con uno standard di scattering confronta lo scattering del campione con quello di uno standard con un rapporto di Rayleigh conosciuto
- Questa calibrazione calibra solo rivelatori a 90°. Altri rivelatori devono essere normalizzati usando un altro standard in un secondo momento
- Il calcolo dei volumi inter-detector e dell'allargamento del picco va effettuato separatamente

Dettagli:

Il principio della calibrazione basata su uno standard di scattering consiste nel riempimento della cella a flusso con un solvente di cui si conosce lo scattering come il toluene. Il toluene ha un rapporto di Rayleigh ben caratterizzato (rapporto tra la luce scatterata e l'intensità della luce incidente), quindi misurando il segnale dovuto al toluene è possibile calcolare lo scattering del campione. R_θ per il campione è calcolato con l'equazione:

$$R_\theta = \frac{I_A n_0^2}{I_T n_T^2} R_T$$

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

Dove:

- $R\theta$ = Rapporto di Rayleigh del campione
- I_A = Intensità scatterata dal campione
- n_0 = Indice di rifrazione del solvente del campione
- I_T = Intensità scatterata dal toluene
- n_T = Indice di rifrazione del toluene
- R_T = Rapporto di Rayleigh del toluene

Il peso molecolare del campione viene poi calcolato inserendo questo valore di $R\theta$ nell'equazione di Rayleigh. La costante di calibrazione in questa situazione è essenzialmente:

$$k_{ls} = \frac{1}{I_T n_T^2} R_T$$

Sebbene non sia necessario un valore di peso molecolare per calibrare il detector, il principio di calibrazione con uno standard di scattering è sostanzialmente lo stesso nel senso che si usa uno standard per misurare la risposta di un detector con un campione di capacità di scattering nota.

Questo metodo ha vari altri svantaggi significativi:

- Poiché lo standard di scattering è un solvente diverso da quello in cui si fanno le misure, quindi con un indice di rifrazione diverso, può essere usato solo per calibrare il detector a 90° . Tutte le altre risposte di un sistema con più di un angolo devono essere normalizzate rispetto al detector a 90° . Questo richiede di fare passare uno standard nel sistema per misurare i fattori di normalizzazione di ogni detector diverso di 90° . Un fattore di normalizzazione è semplicemente un multiplo della costante di calibrazione, cioè un'altra costante di calibrazione.
- In più, la calibrazione con uno standard di scattering non permette la correzione legata ai volumi inter-detector, all'allargamento dei picchi (peak broadening), questa va quindi fatta separatamente, durante la normalizzazione o in un'altra tappa.
- La calibrazione con lo standard di scattering richiede che il rivelatore sia portato off-line, rendendo la procedura molto più lunga e tediosa, e spesso richiede l'invio dello strumento in fabbrica. Inoltre questo implica una difficoltà oggettiva nella verifica di validità della calibrazione nel tempo.

In conclusione, la calibrazione usando uno standard di light scattering richiede più lavoro senza migliorare la qualità della calibrazione e crea più ostacoli alla realizzazione di una calibrazione accurata del sistema.

Applicazione
Polimeri
Biomolecole
Tecnica
GPC/SEC
Peso Molecolare

References

- Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes
[http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/\\$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf)
- A basic guide to particle characterization
[http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB003174/\\$file/MRK1806-01.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB003174/$file/MRK1806-01.pdf)
- Protein and polymer molecular weight by GPC/SEC
[http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB002319/\\$file/MRK1348-01.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB002319/$file/MRK1348-01.pdf)
- Classical Light Scattering From Polymer Solutions. Kratochvil, P. (1987) Elsevier
Modern Size Exclusion Chromatography. Striegel, A.M. et al. (2009) John Wiley & Sons

www.alfatest.it
alfatestbio.it
alfatestlab.it

info@alfatest.it

ALFATEST Srl
Via Giulio Pittarelli 97
00166 Roma