www.analytik-news.de

Publikationsdatum: 29.04.2015

Grundlagen der Feld-Fluss-Fraktionierung

Dr. Gerhard Heinzmann

Postnova Analytics GmbH

Die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) ist eine Technik, die ähnlich wie die Gelpermeationschromatographie (GPC/SEC) die in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten oder dispergierten Probenmoleküle und -teilchen in einem Trennkanal auftrennt und danach mit einer geeigneten Technik detektiert. Während bei der GPC/SEC die Trennung der Probenmoleküle aufgrund von Diffusion in die Poren des Trennsäulenmaterials erfolgt, wird bei der FFF ein quasi leerer Kanal als Trennmedium verwendet. Die Trennung findet durch ein Feld statt, das in einem 90°-Winkel zum Elutionsstrom angelegt wird (Abbildung 1).

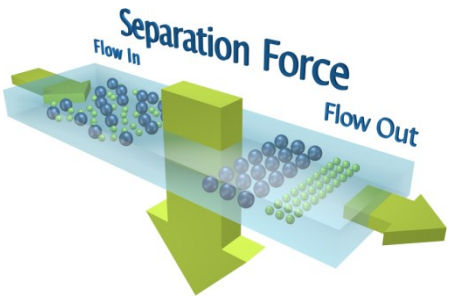

Abb. 1: Trennmechanismus in der Feld-Fluss-Fraktionierung

Wird als Feld ein Querfluss verwendet, dann spricht man von der Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung. Die heute am meisten verbreitete Technik ist die asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung, auch kurz als AF4 bezeichnet. Hier wird nur auf einer Seite des Kanals ein Querfluss abgeleitet während die andere Seite statisch ist (Abbildung 2). Mit der AF4 können sowohl synthetische Polymere in organischen Lösungs- und Laufmitteln wie auch Biopolymere und Proteine bzw. Antikörper in wässrigen Lösungs- und Laufmitteln sowie Nanopartikel aller Art getrennt und charakterisiert werden. Die AF4 wird daher als universeller Separator bezeichnet.

Wird als Querfeld ein Schwerefeld verwendet, das durch die schnelle Drehung einer Rotationseinheit aufgebaut wird, dann spricht man von der Zentrifugal-FFF (Abbildung 3). Die Zentrifugal-FFF hat sich als hervorragende Trenntechnik für Nano- und Mikropartikel etabliert.

Das Querfeld kann auch durch einen Temperaturgradienten erzeugt werden. In diesem Fall spricht man von der Thermischen FFF (Abbildung 4). Im Fall der Thermischen FFF besteht der Trennkanal aus einer oberen beheizten Platte und einer unteren Platte, die gekühlt wird. Dabei können Temperaturunterschiede von bis zu 120°C erreicht werden. Durch den entstehenden Temperaturgradienten werden die Moleküle während der Elution aufgetrennt. Die Thermische FFF eignet sich vor allem für die Auftrennung und Charakterisierung von synthetischen Polymeren in organischen Lösungs- und Laufmitteln.

Schließlich gibt es noch die sehr einfache Gravitations-FFF (Abbildung 5), bei der Mikropartikel durch ihr Sedimentationsverhalten im Schwerefeld der Erde nach Ihrer Größe aufgetrennt werden. Dieses Verfahren kann zur präparativen und kontinuierlichen Auftrennung von Proben angewendet werden.

In jeder der aufgeführten FFF-Methoden wird die Trennkraft durch die Stärke des angelegten Trennfeldes definiert: Je stärker das angelegte Feld desto höher die Trennkraft. Lediglich bei der Gravitations-FFF ist die Trennkraft durch die Erdanziehungskraft festgelegt und somit nicht variabel einstellbar.

Da die verschiedenen FFF-Techniken auf unterschiedlichen physikalischen Trennprinzipien beruhen werden die Probenmoleküle und -teilchen auch nach unterschiedlichen Kriterien aufgetrennt:

- In der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung werden die Probenmoleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius und ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.
- In der Zentrifugal-FFF werden die Nano- und Mikropartikel nach ihrem hydrodynamischen Radius und ihrer Dichte aufgetrennt.
- In der Thermischen FFF werden die Polymermoleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius bzw. ihrem Molekulargewicht sowie ihrer chemischen Zusammensetzung aufgetrennt.

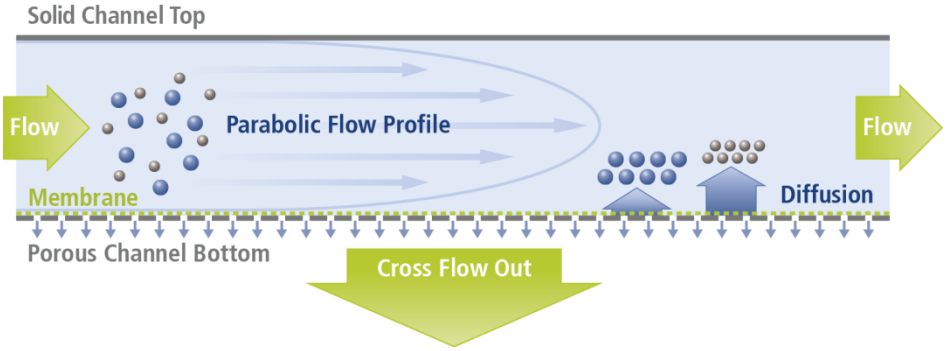

Abb. 2: Prinzip der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)

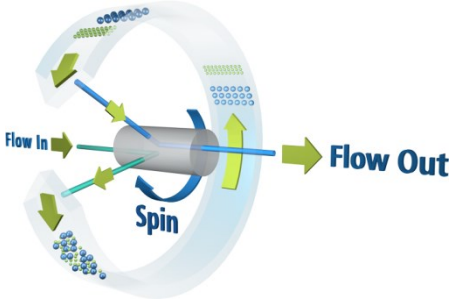

Abb. 3: Prinzip der Zentrifugal-FFF

Der Aufbau der einzelnen FFF-Systeme (Asymmetrisch, Zentrifuge, Thermisch) wird in nachfolgenden Artikeln detailliert beschrieben.

Die Detektion der aufgetrennten Probenmoleküle und -teilchen kann durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Detektionstechniken erfolgen.

Prinzipiell unterscheidet man zwischen Konzentrationsdetektoren, die primär die Konzentration der Probe an jedem Punkt des Elutionsvolumens bestimmen und Absolutdetektoren, die direkt die molekulare Masse und/oder die Größe der Probe erfassen können.

Als Konzentrationsdetektoren eignen sich je nach Art und chemischer Beschaffenheit der Probe z. B. Brechungsindex-Detektoren (RI = Refractive Index Detector), UV-Detektoren (Single Wavelength- oder Diodenarray-Detektor (DAD), Fluoreszenzdetektoren und Verdampfungs-Lichtstreudetektoren (ELSD = Evaporative Light Scattering Detector).

Als Absolutdetektoren haben sich statische Lichtstreudetektoren (MALS = Multi-Angle Light Scattering Detector) und dynamische Lichtstreudetektoren (DLS = Dynamic Light Scattering Detector) am Markt etabliert. Mit einem MALS-Detektor können sowohl die absoluten Molekulargewichte von Polymer-, Biopolymer-, Protein- und Antikörperproben als auch die Trägheitsradien (Rg = Radius of Gyration) dieser Proben sowie die Größen (Trägheitsradien) von Nanopartikeln bestimmt werden. Mit einem DLS-Detektor hingegen können die hydrodynamischen Radien (Rh) der (Bio)Polymerproben und Nanopartikel bestimmt werden.

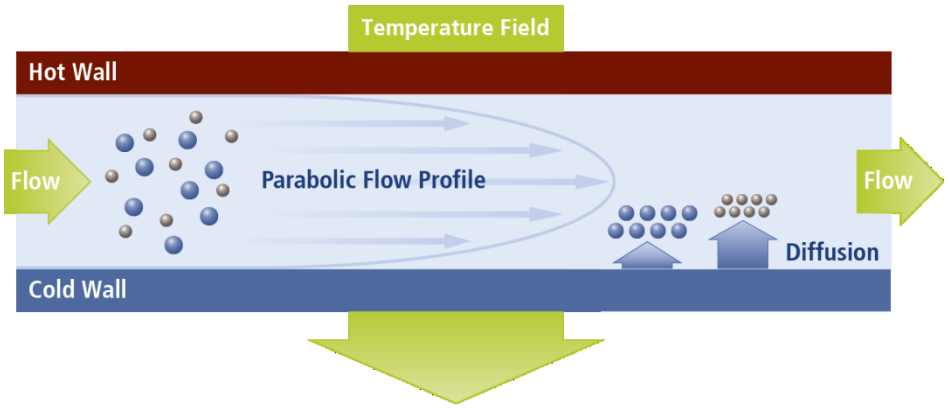

Abb. 4: Prinzip der Thermischen FFF

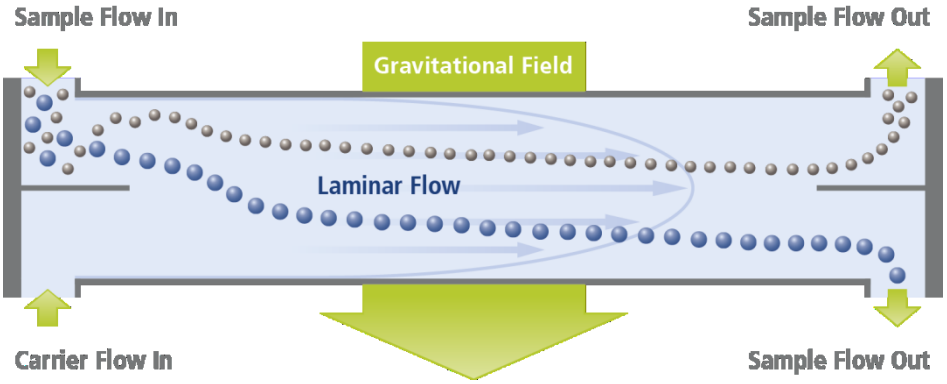

Abb. 5: Prinzip der Gravitations-FFF

Details zu den einzelnen Detektionstechniken werden in nachfolgenden Applikationsbeispielen näher erläutert.

Ein weiterer Punkt ist die chemische Identifikation der Probe mit Online-Kopplung der FFF mit der Massenspektrometrie (ICP-MS). Hier wird der Fluss, der aus der FFF kommt direkt, in die Sprühkammer eines ICP-MS-Instruments geführt. Somit können, nach der Auftrennung, die einzelnen Peaks online auf Ihre chemische Natur hin untersucht werden. Es kann z. B. direkt festgestellt werden, ob es sich bei einem Nanopartikel um ein Titan- oder Silber- oder Goldpartikel handelt.