

Feldflussfraktionierung – Trennung und Charakterisierung von Proteinen, Polymeren und Partikeln

Dr. Thorsten Klein, Dipl.-Chem. Evelin Moldenhauer

Postnova Analytics GmbH, 86899 Landsberg/Lech, Germany, www.postnova.com

Die Feldflussfraktionierung (www.field-flow-fractionation.com) ist eine leistungsfähige Methode zur schnellen und schonenden Größentrennung sowie Charakterisierung einer Vielzahl von Proteinen, Polymeren und Partikeln. Sie schließt die Lücke im Bereich der Analytik kleiner und mittelgroßer Moleküle < 1 nm / 1 kDa auf der einen Seite und von makroskopischen Partikeln > 100 µm auf der anderen Seite.

Der eigentliche Vorteil der FFF-Technologie gegenüber chromatographischen Methoden wie zum Beispiel der SEC, liegt in der schnellen, schonenden und hoch auflösenden Trennung über einen sehr großen dynamischen Separationsbereich. Der Arbeitsbereich erstreckt sich, je nach FFF-Methode, von 10³ Da bis 10¹² Da bzw. 1 nm bis 100 µm.

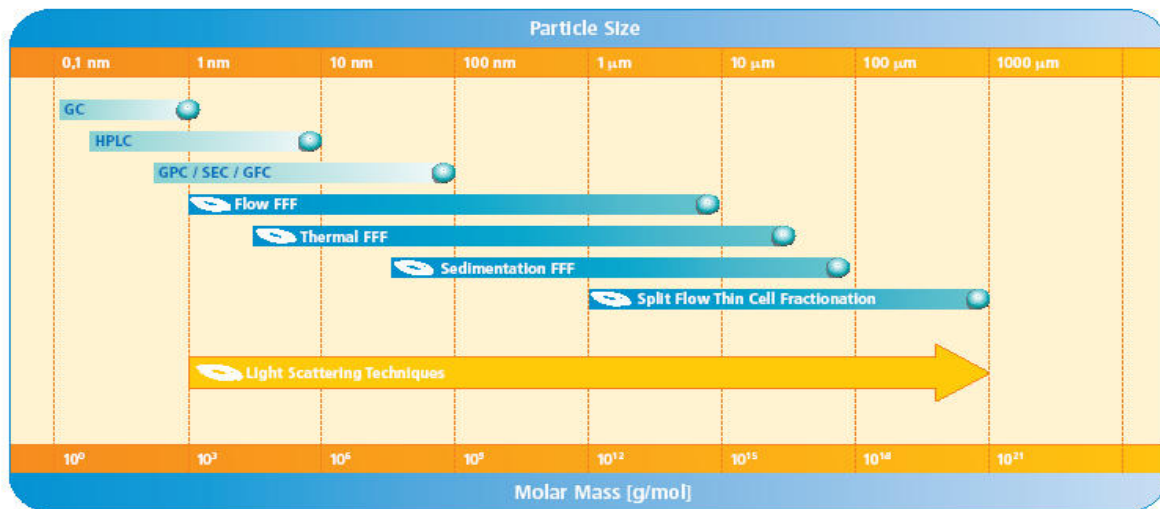


Abbildung 1: Trennbereich der FFF-Methoden

Die Feldflussfraktionierung kann in vielen Bereichen der Forschung eingesetzt werden. In der Literatur sind Anwendungen aus den Bereichen Pharma/Biotech, Chemie/Polymere, Umweltwissenschaften, Food/Agro/Cosmetics und Nanotechnologie beschrieben worden.

Abbildung 2 gibt einen Überblick über einige der möglichen FFF-Anwendungsbereiche.

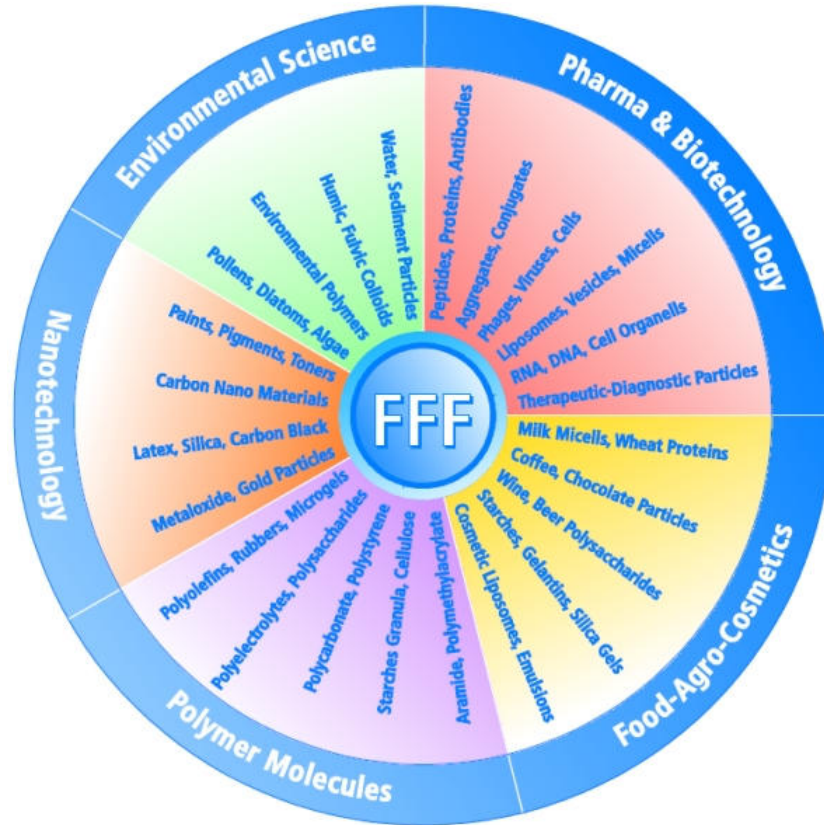


Abbildung 2: Anwendungsbereiche der FFF

Zur Geschichte der FFF



Abbildung 3: Prof. Giddings, Erfinder der FFF

Die Feldflussfraktionierung wurde 1966 von Prof. Calvin Giddings (1930-1996), einem Wissenschaftler der Universität Utah in Salt Lake City, USA, erfunden [01]. Prof. Giddings gründete das FFF Research Center an der Universität Utah und entwickelte dort mit seinem Team die zugrunde liegende Theorie sowie die verschiedensten FFF-Varianten, wie zum Beispiel die Thermische FFF [02], die Sedimentations FFF [03], die Fluss FFF [04] und die Splitt FFF [05]. In den Folgejahren wurde Giddings zweimal für den Nobelpreis vorgeschlagen. Im Jahre 1987 schließlich publizierte er zusammen mit Prof. Wahlund die erste Asymmetrische Fluss FFF [06] als eine weitere Variante der Fluss FFF.

Im Bereich der Detektoren für die FFF veröffentlichte Prof. Michel Martin von der Universität Paris 1984 als erster Arbeiten über die Kopplung von FFF mit der Laserlichtstreuung [07, 08]. Durch die Kopplung der FFF als Trennmethode mit Lichtstreuung (LS) als Detektionsmethode konnte die Technologie von nun an für eine Vielzahl von Applikationen eingesetzt werden. Die FFF-LS-Technologie hat für die Charakterisierung von Proteinen, Polymeren und Partikeln mittlerweile die

gleiche Bedeutung, wie sie die GC- und LC-MS für die Charakterisierung von kleineren Molekülen innehaben.

1986 gründete Prof. Giddings mit seinen Mitarbeitern die erste FFF-Firma mit Namen FFFractionation Inc. in Salt Lake City. Hier wurden auch die weltweit ersten kommerziellen FFF-Systeme entwickelt [09, 10, 11, 12] und zunächst in den USA, später auch in Europa und Asien vermarktet. Im Jahr 1996 verstarb Prof. Giddings. Kurz darauf wurde im Jahr 1997 in München jedoch bereits eine weitere FFF-Unternehmung, die Fa. Postnova Analytics, gegründet. Diese übernahm 2001 die Firma FFFractionation und ist bis heute weltweit der einzige Anbieter eines kompletten FFF-Produktportfolios, bestehend aus Fluss, Thermischer, Sedimentations und Splitt FFF, gekoppelt mit Lichtstreu- und anderen Detektoren.

Die bislang letzte bedeutende Innovation im Bereich der FFF fand im Jahr 2006 statt, als die weltweit erste Hochtemperatur Fluss FFF publiziert wurde [13].

Das Trennprinzip der FFF

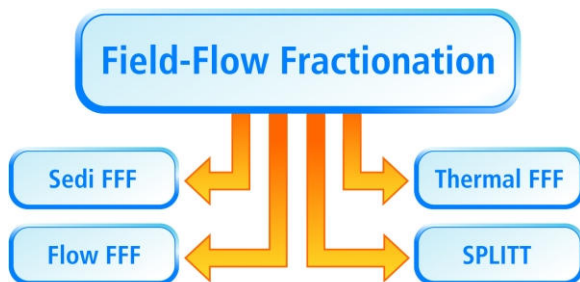


Abbildung 4: Die wichtigsten FFF-Varianten

Die Feldflussfraktionierung stellt eine Familie chromatographieähnlicher Separationstechniken dar. Allen FFF-Methoden gemeinsam ist die Verwendung eines speziellen, sehr flachen Trennkanals an Stelle der bei der Chromatographie verwendeten Säule. Dieser Trennkanal enthält keine stationäre Phase, sondern wird nur vom jeweiligen Lösungsmittel durchströmt. Aufgrund der geringen Kanalhöhe (ca. 350 µm) bildet sich bei den üblichen Flussraten von 1 mL/min ein laminarer Fluss mit einem parabolischen Strömungsprofil aus. Die eigentliche Auftrennung der Analyten erfolgt durch ein Kraftfeld, das senkrecht zu diesem parabolischen Fluss angelegt wird. Dieses Kraftfeld kann eine weitere Flüssigkeitsströmung, ein Temperaturgradient, ein Zentrifugalfeld oder eine andere physikalische Kraft sein. Die unterschiedlichen FFF-Varianten werden dabei nach den verwendeten Kraftfeldern benannt, wie zum Beispiel Fluss FFF, Thermische FFF, Sedimentations FFF.

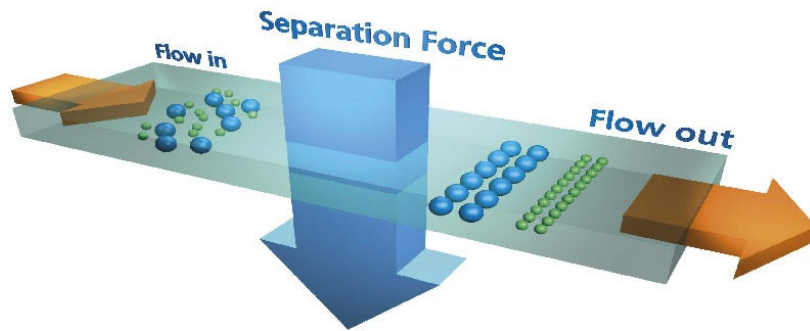


Abbildung 5: FFF-Trennkanaal

Innerhalb des Kanals werden die Teilchen durch die Trennkraft in Richtung der Kanalunterseite gelenkt. Da die Teilchen den Kanalboden nicht passieren können, diffundieren diese zurück in Richtung des Kanalmittelpunkts. Unter dem Einfluss des jeweiligen von oben nach unten wirkenden Kraftfeldes und der von unten nach oben entgegenwirkenden Diffusion der Teilchen erfolgt dann eine Auftrennung der unterschiedlich großen Teilchen. Je nach Diffusionskoeffizient stellt sich nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes eine individuell unterschiedliche Schichtdicke der einzelnen Probenspezies ein. Kleinere Partikel mit einer stärkeren Diffusion gelangen somit höher in den Kanal in Bereiche größerer Strömungsgeschwindigkeiten und eluieren zuerst. Größere Partikel mit einer schwächeren Diffusion gelangen dagegen nur in Bereiche mit geringeren Strömungsgeschwindigkeiten und eluieren dadurch erst später.

Fluss FFF

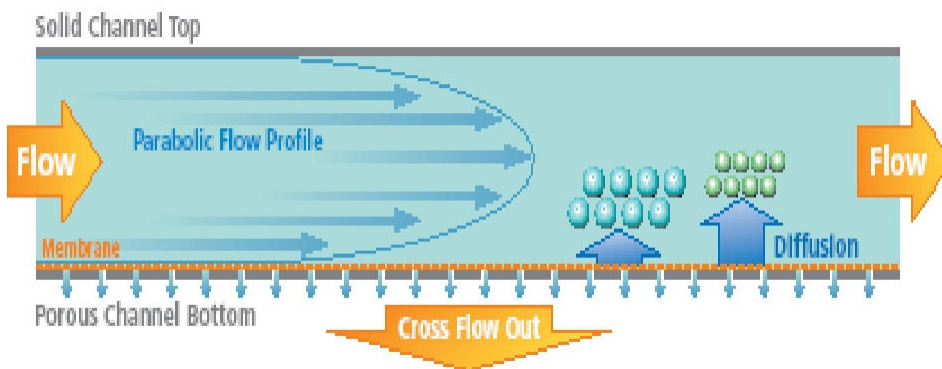


Abbildung 6: Querschnitt durch einen Asym. Fluss-FFF-Kanal

In der Fluss-FFF wird die Trennkraft durch einen Querfluss erzeugt. Dabei kann man zwei Anwendungsarten unterscheiden, die Symmetrische Fluss-FFF und die Asymmetrische Fluss-FFF. Bei der Symmetrischen Fluss-FFF bestehen die Ober- und die Unterseite des Kanals aus durchlässigen Fritten durch welche der Querfluss geleitet wird. Auf der unteren porösen Fritte ist eine Membran aufgebracht, welche das Lösungsmittel, nicht jedoch die Probenteilchen, hindurch lässt. Bei der Asymmetrischen Fluss-FFF dagegen verwendet man üblicherweise einen Kanal, der als

obere Begrenzung eine feste undurchlässige Wand besitzt. Wie bei der Symmetrischen Fluss-FFF auch, besteht die untere Kanalbegrenzung aus einer porösen Fritte mit einer darauf befindlichen Membran. Wie bei den anderen FFF-Varianten auch, wird längsseits durch den Trennkanal ein Trägerstrom geleitet, der ein laminares Strömungsprofil ausbildet. Im Gegensatz zu den anderen FFF-Methoden, wird bei der Asymmetrischen Fluss-FFF aber kein externes Trennfeld angelegt. Der Querfluss wird als Teilströmung vom Hauptstrom der Trägerflüssigkeit im Kanal abgezweigt und durch die untere Membran hindurch abgeleitet. Wie bei der Symmetrischen Fluss-FFF verhindert die Membran, dass die Probenteilchen mit dem Querstrom aus dem Kanal entweichen können.

Die Fluss-FFF kann mit wässrigen und organischen Lösungsmitteln verwendet werden. Sie wird in den Bereichen Biotech/Pharma, Chemie/Polymere, Food/Agro sowie Umwelt eingesetzt. Die Hauptanwendungen liegen in der Charakterisierung von Proteinen, Antikörpern, Aggregaten, Viren, Chitosanen, Alginaten, Polyacrylamiden, Mizellen, Liposomen, Huminkolloide. Damit ist die Fluss-FFF die universellste FFF-Technik mit dem breitesten Anwendungsbereich. Nachfolgend sind einige Applikationsbeispiele aufgeführt:

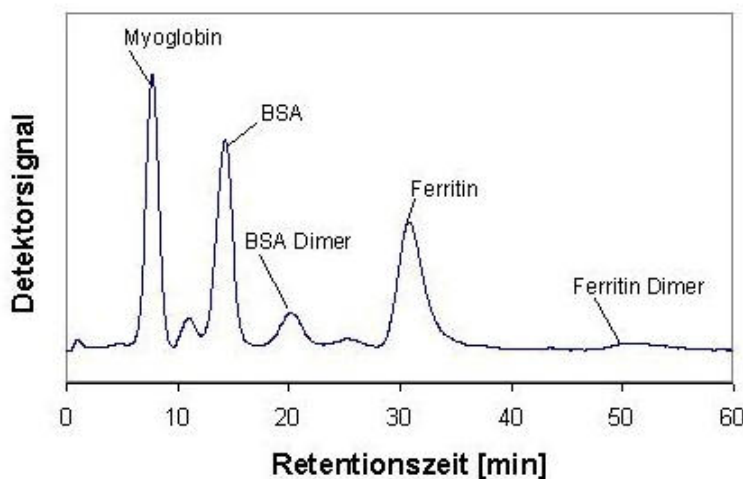


Abbildung 7: Trennung von Proteinen mit Asym. Fluss-FFF

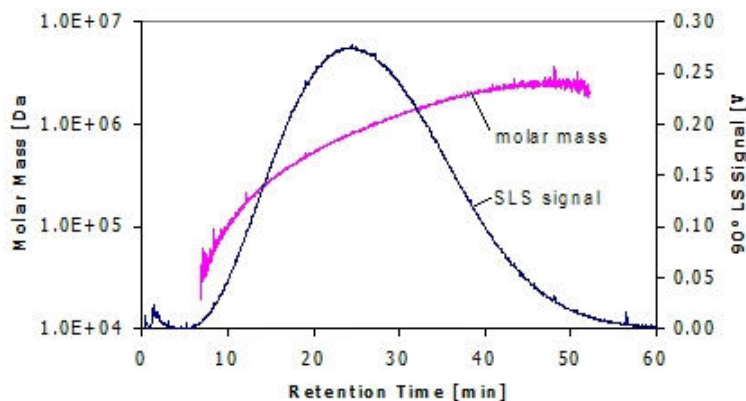


Abbildung 8: Charakterisierung von Polyacrylamid mit Asym. Fluss-FFF

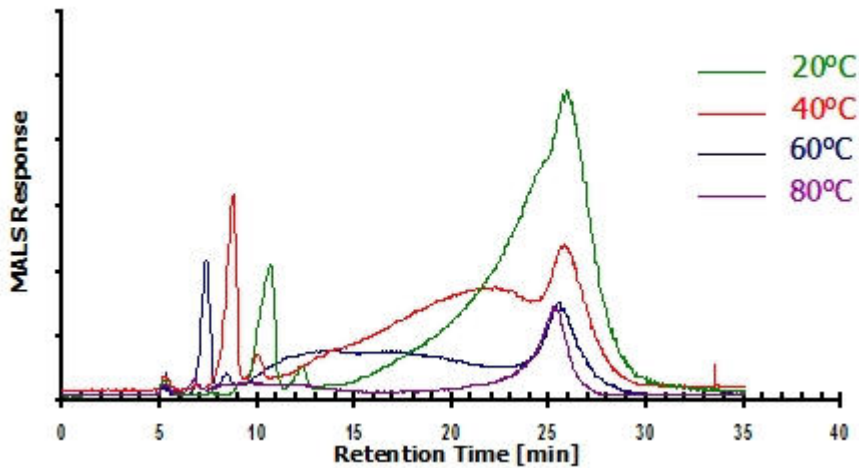


Abbildung 9: Trennung von Antikörperaggregaten mit Mitteltemperatur Fluss-FFF

Spezielle Vorteil der Fluss FFF

1. Trennung von Proteinen, Polymeren und Partikeln
2. Großer dynamischer Trennbereich
3. Verwendung von wässrigen und organischen Lösungsmitteln
4. Möglichkeit zur Fokussierung/Aufkonzentrierung der Probe

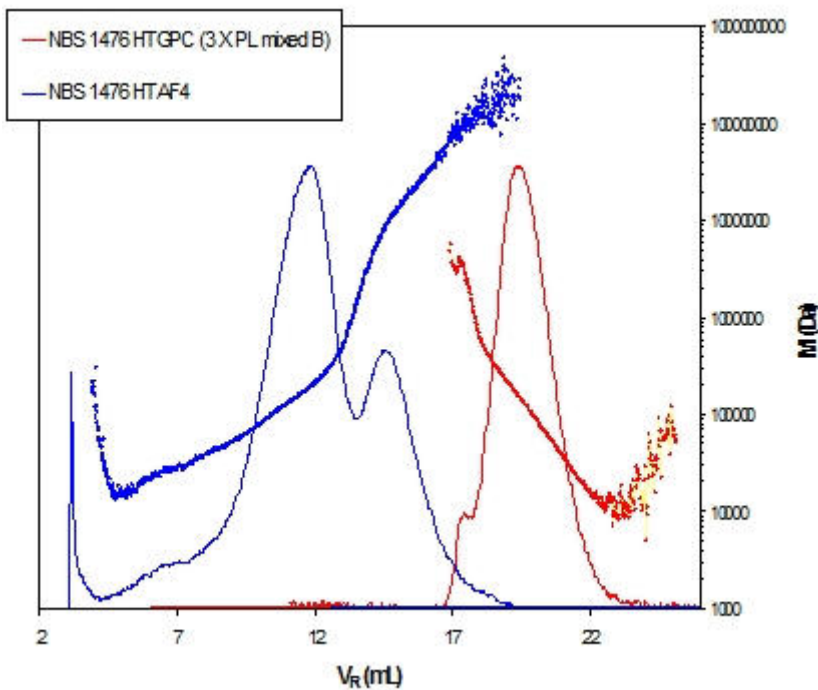


Abbildung 10: Overlay Trennung von LD Polyethylen (NIST-Stand.) mit HT-AF4 (blau) und HT-GPC (rot) [13]

Thermische FFF

Die Thermische FFF verwendet die thermische Diffusion zur Erzeugung einer Retention. Dabei wird ein Temperaturgradient zwischen der oberen und unteren Begrenzung des FFF-Kanals aufgebaut. Der Kanal befindet sich zwischen zwei Metallblöcken, wobei der obere exakt beheizt und der untere Block präzise gekühlt wird. Die entstehende Temperaturdifferenz induziert eine unterschiedlich starke thermische Diffusion der zu trennenden Teilchen und Polymere. Der Thermischen Diffusion wirkt die normale Diffusion der Teilchen entgegen. Die Thermische Diffusion und die normale Diffusion sowie die Größe des Temperaturgradienten bestimmen die Schichtdicke der einzelnen Probenspezies im Kanal. Komponenten mit einer größeren Molmasse bewegen sich näher an der unteren Kanalbegrenzung und somit im Bereich geringerer Strömungsgeschwindigkeiten. Kleinere Anteile dagegen bewegen sich weiter entfernt von der unteren Kanalwandung in schnelleren Strömungslinien und werden dadurch zeitiger eluiert.

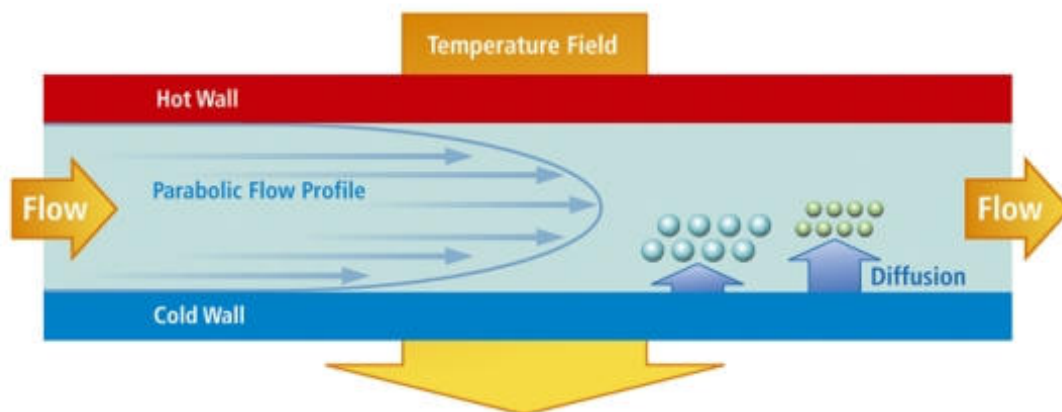


Abbildung 11: Funktionsprinzip der thermischen Feldflussfraktionierung

Der thermische Diffusionskoeffizient ist im Gegensatz zum normalen Diffusionskoeffizienten von der Molmasse der Teilchen unabhängig. Er wird jedoch von der chemischen Zusammensetzung des Analyten beeinflusst. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass die Trennung der unterschiedlichen Anteile einer Probe in der Thermischen FFF nach der Molmasse und der chemischen Zusammensetzung erfolgt.

Die Thermische FFF wird hauptsächlich mit organischen Lösungsmitteln verwendet werden. Sie wird in den Bereichen Chemie/Polymere sowie Nanotech eingesetzt. Die Hauptanwendungen liegen in der Charakterisierung von komplexen Polymeren und Gelmaterialien. Nachfolgend sind einige Applikationsbeispiele aufgeführt:

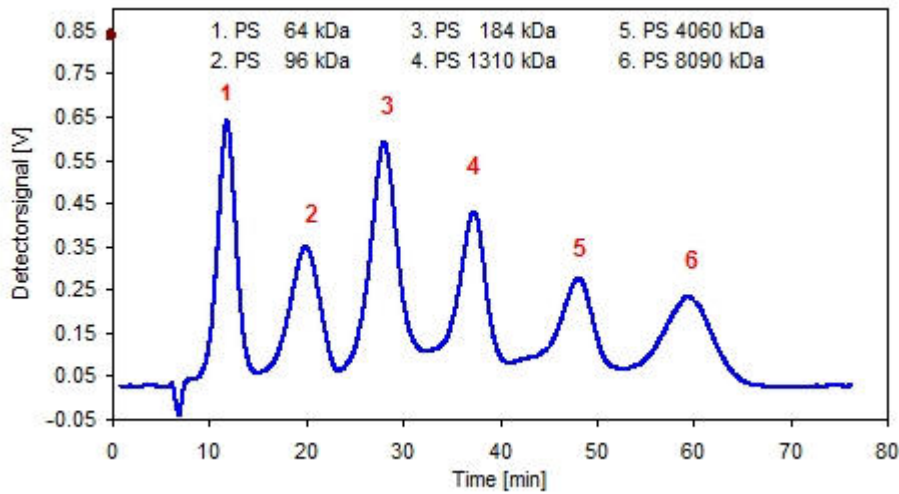


Abbildung 12: Trennung eines Polystyrolpolymer-Gemisches in THF mit Thermischer FFF.

Spezielle Vorteile der Thermischen FFF

1. Höchstauflösung für Polymer/Gel-Trennungen
2. Kompatibel mit fast allen gängigen organischen Lösungsmitteln
3. Trennung nach Molmasse und chemischer Zusammensetzung

Sedimentations FFF

In der Sedimentations FFF verwendet man einen rotierenden Ringkanal, wobei das Trennfeld durch die Zentrifugalkraft erzeugt wird. Der Aufbau ist im nächsten Bild dargestellt.

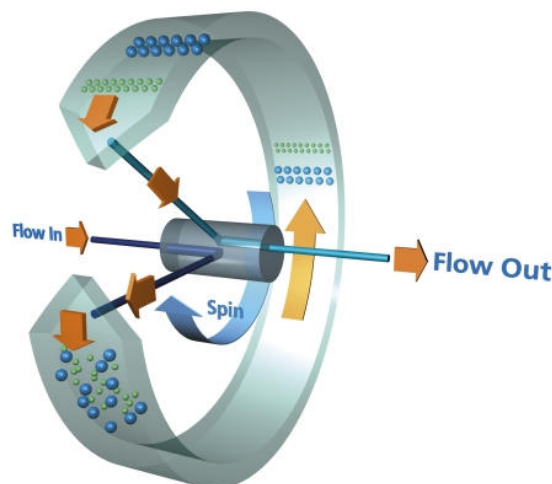


Abbildung 13 : Schematischer Aufbau eines Sedimentations FFF-Kanals

Der Kanal hat wiederum eine Höhe von 350 μm , so dass sich ein laminarer Fluss mit einem parabolischen Strömungsprofil ausbildet. Die Elution der Teilchen wird durch die Umdrehungszahl des Ringkanals bestimmt, wobei die Trennung entsprechend den Unterschieden in der Dichte und der Masse der Komponenten des Analyten erfolgt.

Kleinere Teilchen eluieren zuerst gefolgt von den größeren Spezies. Ein Analysenlauf startet mit einer hohen Umdrehungszahl um kleine Anteile abzutrennen, dann wird die Umdrehungszahl verringert um größere Anteile innerhalb einer angemessenen Zeit zu eluieren. Damit wird die Charakterisierung von polydispersen Proben möglich. Typische Anwendungsbereiche sind die Separation von Emulsionen, Kolloiden, Partikeln, Drug Delivery-Systemen und Zellen.

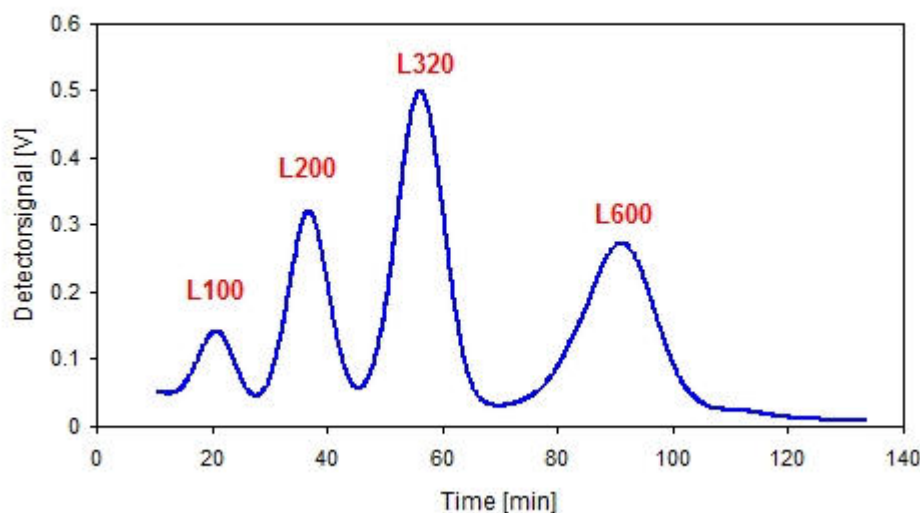


Abbildung 14: Trennung von Latexpartikeln mittels Sedimentations FFF ($d_p = 100, 200, 320$ und 600 nm)

Spezielle Vorteil der Sedimentations FFF

1. Höchstauflösung für die Partikeltrennung
2. Großer dynamischer Trennbereich speziell für Partikel
3. Trennung nach Partikelgröße und Dichte

SPLITT

Die SPLITT-FFFF ist eine kontinuierlich ablaufende präparative Trenntechnik für Partikel im Mikrometerbereich. Die Separation basiert auf den unterschiedlichen Sedimentationsraten der Partikel im Kanal unter dem Einfluss des Erdschwerkraftfeldes. Die Bauweise des SPLITT- Kanals ermöglicht eine schnelle Separation im Bereich von Sekunden bzw. Minuten, da die Partikel nur über eine relative kleine Strecke, üblicherweise 500 μm , sedimentieren müssen. Der hydrodynamisch stabile laminare Flüssigkeitsstrom im SPLITT-Kanal bildet das Transportmedium

für die Teilchen. Aufgrund des kontinuierlichen Durchflusses ist die SPLITT-FFF ideal zur Aufreinigung von Partikelsystemen geeignet.

Die SPLITT-FFF wird im Bereich Chemie/Polymere und Umwelt eingesetzt. Die Hauptanwendungen liegen im Bereich der Charakterisierung von komplexen Umweltpartikelproben, Diatomeen, Algen, Sedimentpartikel, chromatographischer Medien, sowie der präparativen Aufreinigung einer Vielzahl von industriellen partikulären Produkten.

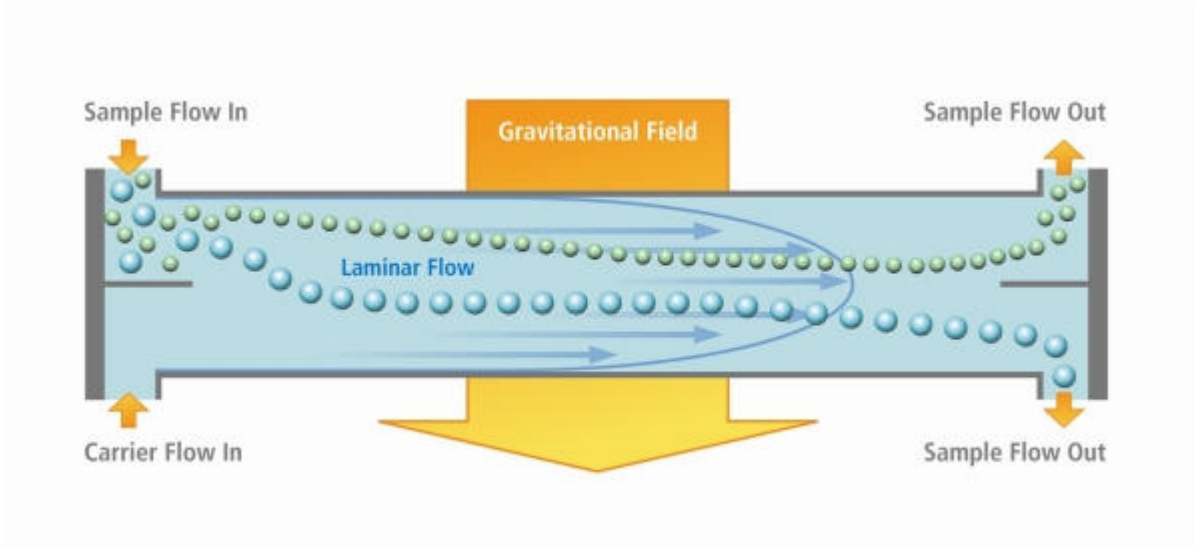


Abbildung 15 : Trennprinzip der SPLITT-FFF

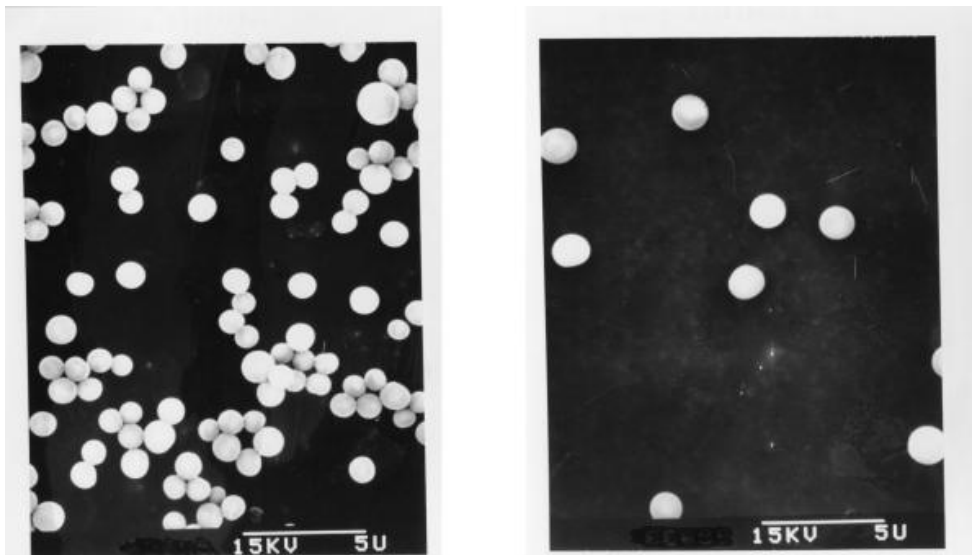


Abbildung 16 : SPLITT-Trennung einer Latexpartikelmischung.
Bild links: Mischung 5 und 10 µm, Bild rechts: gereinigte 10 µm Fraktion.

Zusammenfassung

Die FFF-Technologie ist eine leistungsfähige Analysenmethode zur schnellen, schonenden und hoch auflösenden Trennung und Größencharakterisierung von Proteinen, Polymeren und Partikeln. Die FFF zeichnet sich insbesondere durch die folgende Eigenschaften aus:

- Großer dynamischer Massen-/Größenbereich analysierbar (1 nm -100 µm, 10³ Da-10¹² Da)
- Schnelle, schonende Trennungen ohne Scherkräfte im Kanal
- Keine Wechselwirkung mit der stationäre Phase wie bei der LC
- Höhere Auflösung als chromatographische Trennungen > 10⁵ Da
- Flexible Auswahl der Trennbedingungen, wie z.B. Lösungsmittel, Trennschärfe
- Möglichkeit zur Fraktionierung der getrennten Fraktionen
- On-line/Off-line-Kopplung mit weiteren Analyseverfahren, wie z.B. MS, EM, NMR

Literatur

- [1] J.C. Giddings, "New separation concept based on a coupling of concentration and flow non-uniformities", *Separation Sci.*, 1 123-125 (1966).
- [2] G.H. Thompson, M.N. Myers, and J.C. Giddings, "Thermal Field-Flow Fractionation of Polystyrene Samples", *Anal. Chem.*, 41 1219-1222 (1969).
- [3] J.C. Giddings, F.J.F. Yang, M.N. Myers, "Sedimentation Field-Flow Fractionation", *Anal. Chem.*, 46 1917-1924 (1974).
- [4] J.C. Giddings, F.J. Yang, M.N. Myers, "Flow Field-Flow Fractionation: A Versatile New Separation Method", *Science*, 193 1244-2145 (1976).
- [5] J.C. Giddings, "A System Based on Split-Flow Lateral-Transport Thin (SPLITT) Separation Cells for Rapid and Continuous Particle Fractionation", *Sep. Sci. Technol.*, 20 749-768 (1985).
- [6] Wahlund, K.G.; Giddings, J.C.; "Properties of an Asym. Flow FFF channel having one permeable wall", *Anal. Chem.*, 59 1332-39 (1987).
- [7] Martin, M.; "Polymer analysis by fractionation with on-line light scattering detectors", *Sep. Sci. Technol.*; *Sep. Sci. Technol.*; 19 685-707 (1982).
- [8] Martin, M.; Hes, J.; "On-line coupling of thermal field-flow fractionation with laser light scattering", *Chromatographia*; 15 426-432 (1984).
- [9-12] FFFractionation, Inc., Salt Lake City, Utah, USA "Model F1000", "Model S101", "Model T100", Model "SF1000", Product Brochures, (1986).
- [13] H. DeJonge, E. Mes, T. Klein, R. Welz, "High Molecular Weight Polyolefin Analysis by High Temperature Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation", Oral Presentation/Poster 1st ICPC Conference, Houston, USA, Oct. 15th-18th (2006).