

# Trennung und Charakterisierung von Proteinen, (Bio)Polymeren und Nanopartikeln mit der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)

Dr. Gerhard Heinzmann

Postnova Analytics GmbH

Bei der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung, auch kurz als AF4 bezeichnet, wird als Feld ein Querfluss verwendet. Der Querfluss wird nur auf einer Seite des Trennkanals abgeleitet, während die andere Seite statisch ist (Abbildung 1). Mit der AF4 können sowohl synthetische Polymere in organischen Lösungs- und Laufmitteln als auch Biopolymere und Proteine/Antikörper in wässrigen Lösungs- und Laufmitteln sowie Nanopartikel aller Art getrennt und charakterisiert werden. Die AF4 wird daher als universeller Separator bezeichnet.

Bei der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung wird die Trennkraft durch den Querfluss bestimmt; je höher der Querfluss, umso stärker die Trennkraft. Um eine optimale Trennung zu erreichen, kann daher der Querfluss, ähnlich wie der Lösungsmittelgradient bei einer Gradientenelution, über der Elutionszeit verändert werden. Meist wird die Trennung mit einem hohen Querfluss begonnen und dieser dann entweder linear oder exponentiell auf einen geringen Wert oder auf Null heruntergefahren.

Werden sehr kleine und kompakte Moleküle wie z. B. Proteine und Antikörper mit der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung analysiert, dann wird der Querfluss über einen längeren Zeitraum hinweg auf einem sehr hohen Niveau gehalten und erst gegen Ende der Trennung über einen linearen Gradienten auf Null heruntergefahren. Dadurch können z. B. Monomere, Dimere und höhere Aggregate von Proteinen und Antikörpern getrennt werden (Abbildung 2).

Die beste und leistungsfähigste Methode zur Charakterisierung von Polymeren, insbesondere in organischen Lösungsmitteln, ist die Thermische FFF (TF3), welche im dritten Teil dieser Artikelserie näher behandelt wird. Aber auch die Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung kann für die Trennung und Charakterisierung von synthetischen Polymeren und Biopolymeren verwendet werden. Will man Polymere trennen, dann kann die Trennung mit einem geringeren Querfluss

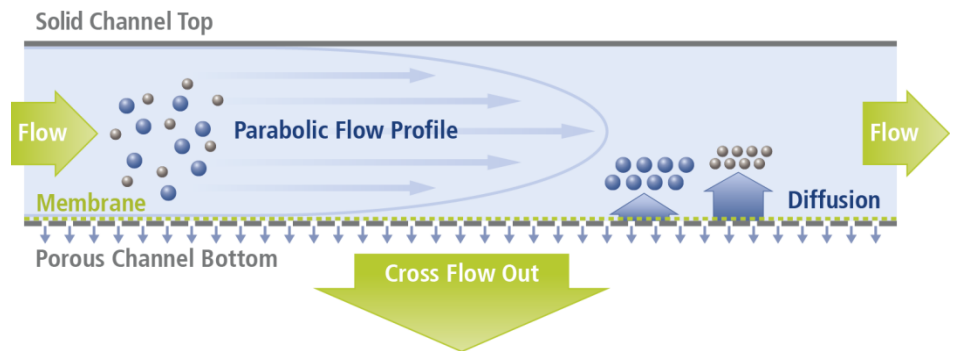


Abb. 1: Prinzip der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)

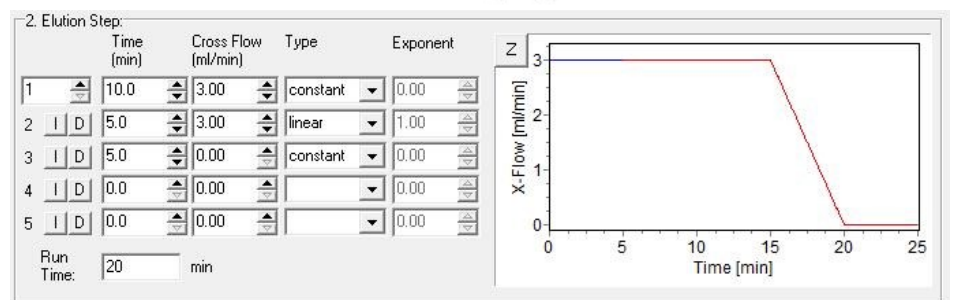
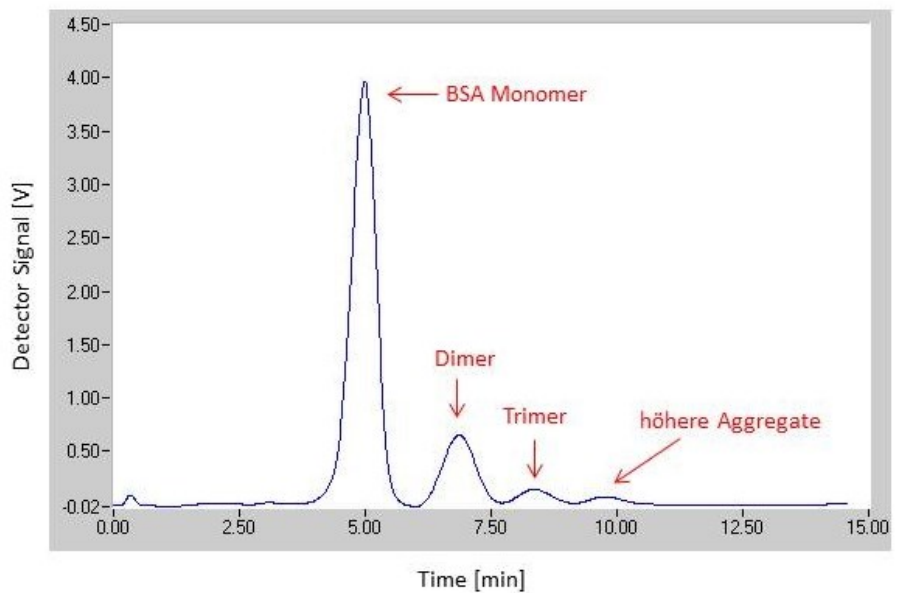


Abb. 2: Trennung einer BSA-Probe (Rinderserumalbumin) mit Verlauf des Querflusses über dem Elutionsvolumen (linearer Gradient)

durchgeführt werden, da Polymere bei gleichem Molekulargewicht meist einen deutlich größeren hydrodynamischen Radius aufweisen als entsprechende globuläre Proteine und somit eine geringere Trennkraft ausreichend ist. In Abbildung 3 ist die Trennung einer Polymerprobe dargestellt.

Die beste und leistungsfähigste Methode zur Trennung von Nano- und Mikropartikeln ist die Centrifugal-FFF (CF3), in der Literatur früher häufig auch als Sedimentations-FFF bezeichnet. Die CF3, die im vierten Teil dieser Artikelserie näher beschrieben wird, erlaubt neben der reinen Größen- auch noch eine zusätzliche Dichte-Trennung der Partikel. Jedoch kann auch die Asymmetrische Fluss-FFF für die Trennung von Partikeln, insbesondere Nanopartikeln, verwendet werden.

Es können Latexpartikel, anorganische Partikel wie Titandioxid (angewendet z. B. in Sonnencremes) und Siliziumdioxid, metallische Partikel wie Silber- und Gold-Nanopartikel, Rußpartikel und Carbon Nanotubes (CNT's) sowie viele weitere Materialien aufgetrennt werden. Als Laufmittel eignet sich oft Wasser mit Salzzusatz und definiertem pH-Wert oder einem geringen Tensidzusatz. Abbildung 4 zeigt die Trennung einer Mischung von drei Latex-Nanopartikeln mit geometrischen Durchmessern von 60 nm, 125 nm und 350 nm in einer 0,2 %-igen Tensid-Lösung. In diesem Fall folgt der Gradient des Querflusses einem exponentiellen Verlauf (sogenannter „Powergradient“).

Als Detektoren eignen sich für die Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung alle Arten von Konzentrationsdetektoren (Brechungsindex (RI), Absorption (UV), Fluoreszenz (FL), Verdampfungslichtstreuung (ELS), und andere) sowie Statische Lichtstreuendetektoren (MALS = Multi-Angle Light Scattering) und Dynamische Lichtstreuendetektoren (DLS). Weiterhin kann die Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung auch direkt an ein ICP-MS Instrument (z. B. Agilent 7900, 8800) gekoppelt werden. Der Fluss aus der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung wird dabei direkt in den Zerstäuber des ICP-MS Gerätes geleitet. Typischerweise wird ein Elutionsfluss von 0,5 mL/min verwendet. Mit dieser Technik kann nach der Trennung durch die Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung direkt eine chemische Identifizierung der Nanopartikel durchgeführt werden.

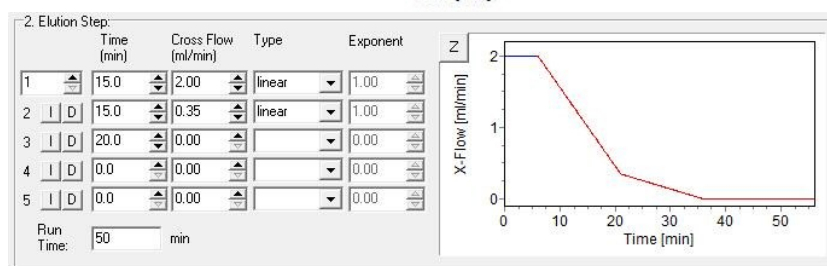
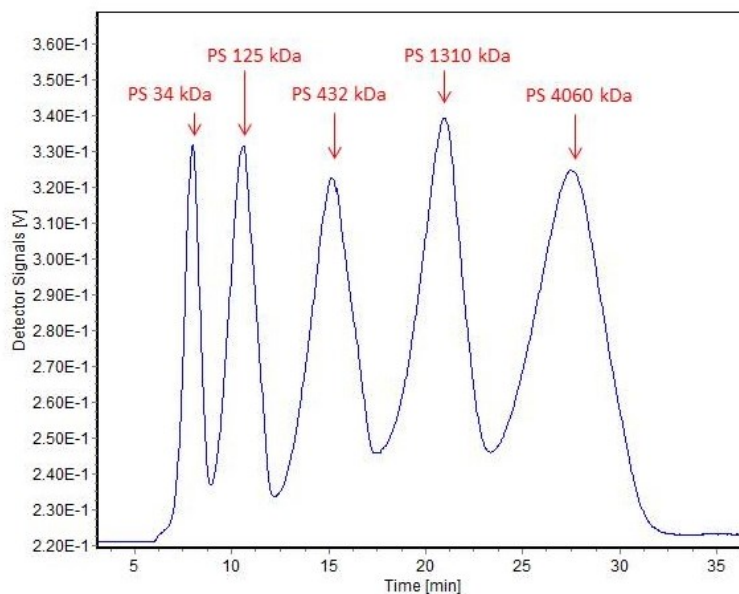


Abb. 3: Trennung einer Polymerprobe (fünf eng verteilte Polystyrolstandards) mit Verlauf des Querflusses über dem Elutionsvolumen

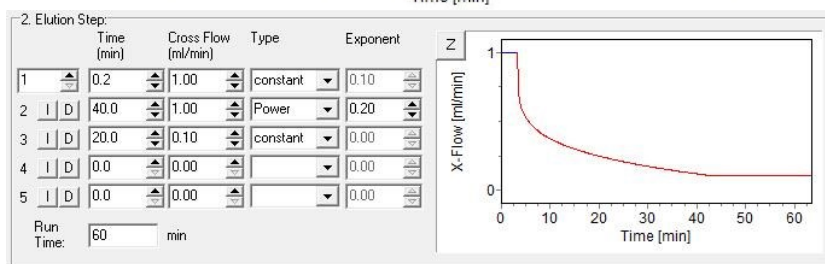
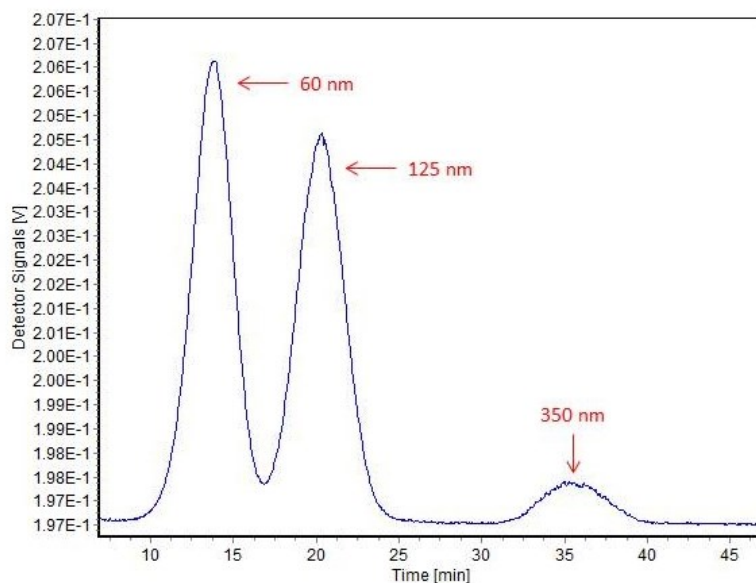


Abb. 4: Trennung von drei Latex-Nanopartikeln (Durchmesser 60 nm, 125 nm und 350 nm) in einer 0,2 %-igen Tensid-Lösung mit exponentiellem Verlauf des Querfluss-Gradienten