

Die Hohlfaser-Feldfluss-Fraktionierung (HF5): Eine neue, leistungsfähige Methode zur Auftrennung komplexer Proteingemische

Christoph Johann, Thomas Jocks

Wyatt Technology Europe GmbH, Hochstrasse 18, DE-56307 Dernbach, Germany

Zusammenfassung:

Dieser Beitrag erläutert Theorie und Praxis der Fluss-Feldflussfraktionierung (F4), die eine hoch aufgelöste Trennung von Gemischen aus Makromolekülen oder Partikeln ermöglicht. Grundlagen und Funktionsprinzipien dieser Technologie werden dargelegt, und die neueste Weiterentwicklung auf diesem Feld, die Hohlfaser-Technologie (HF5), wird vorgestellt. Anhand von Messungen zeigen wir die Vorzüge der HF5 auf, die vor allem dort zum Tragen kommen, wo es um die schonende, effiziente Trennung von Proteinen geht.

Einleitung:

Die Fluss-Feldflussfraktionierung (F4) ist eine Familie von Trennmethode für Moleküle und Partikel, bei der man sich einen hydrodynamischen Querfluss für die Separation zunutze macht. In der Fachwelt bekannt und bereits verbreitet ist die Asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4), bei der ein flacher, länglicher Kanal eingesetzt wird.

In diesem Beitrag stellen wir die Hohlfaser-Fluss-FFF (HF5) von Wyatt Technology vor. Der Kanal besteht aus einer Faser mit porösen Wänden. Wird ein Flüssigkeitsstrom durch die Faser hindurch gepumpt, so kann ein Teil der Strömung durch die Wände austreten und bildet eine Querströmung (Cross-flow) im Verhältnis zur Hauptströmung, die entlang der Faser Richtung Auslass gerichtet ist. Durch Einwirkung des Querstromes, die sich überlagert mit dem parabolischen Flussprofil der Längsströmung, erfolgt eine Trennung der Probenbestandteile, welche auf den unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten der Komponenten und damit auf dem hydrodynamischen Radius bzw. der Molmasse beruht (Abbildung 1).

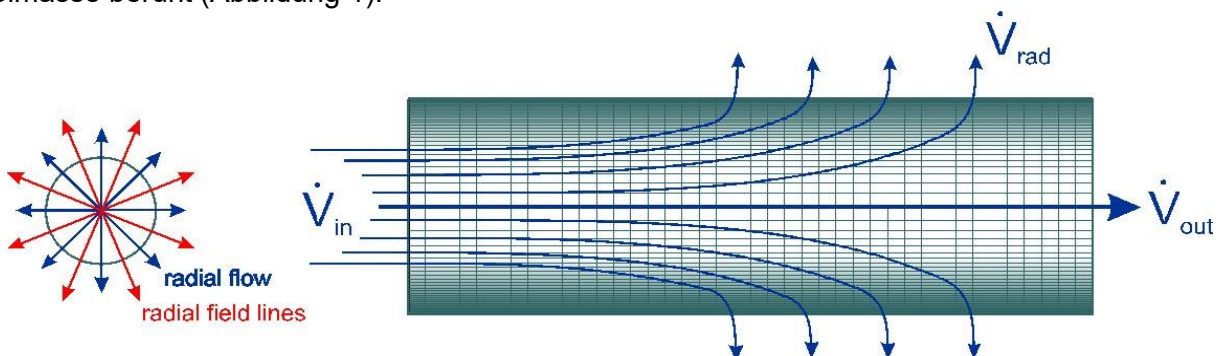


Abbildung 1 (siehe Text)

Der Einsatzbereich der HF5 ist ähnlich breit gefächert wie der anderer F4-Methoden. Der dynamische Bereich dieser Methode reicht ungefähr von 1nm bis 50µm. Dabei lassen sich sowohl gelöste Moleküle als auch Partikel im gleichen Trennvorgang untersuchen. Dieser Umstand kommt

z.B. dann zum Tragen, wenn „freies“ Reagenz unterschieden werden soll von dem Anteil, der an Partikel gebunden hat. Das ist eine Aufgabe, die sich vor allem bei der Entwicklung von „Colloidal Drug-Carrier“ Systemen stellt [1]. Ein besonderer Vorzug dieser Trennmethode ist auch, dass sie – anders als die Säulenchromatographie – ohne stationäre Phase arbeitet. Daher kommt es auch weit weniger zu Wechselwirkungen wie zum Beispiel der Absorption von Probenmaterial.

Bereits 2002 wurden vielversprechende Ergebnisse zur Separation von Polymeren mittels HF5 publiziert [2]. Weitere Gruppen arbeiten vor allem an der Auftrennung von Proteinen, Partikeln oder auch an der Zellfraktionierung mittels HF5 [3-6]. Ein besonderer Vorteil ist die geringe Probenverdünnung, die aus dem Kanalvolumen von weniger als 100µl und den niedrigen Detektorflussraten resultiert. Daher bietet es sich an, die HF5 als Trennverfahren für die anschließende Analyse mittels Massenspektrometrie einzusetzen. Bereits vorliegende Ergebnisse belegen, dass die HF5 das Potential hat, zu einem wichtigen Werkzeug in der Proteomics-Forschung zu werden. [7-10] Überdies stellt auch die Umweltanalytik ein Anwendungsgebiet dar, etwa wenn es um den Nachweis von möglicherweise schädlichen Nanomaterialien in Luft und Boden, in Lebensmitteln und anderen Produkten geht.

Das Material, aus dem die Hohlfasern hergestellt werden, ist relativ preiswert, so dass man kostengünstige HF5-Kartuschen als Einmalartikel herstellen kann. Dies eliminiert auf elegante Weise sämtliche Probleme, die in der Vergangenheit in punkto Kammersterilität oder Probenverschleppung auftraten. Während in der AF4 der Kanal geöffnet werden muss, um die Flachmembran zu wechseln, kann in der HF5 der gesamte Kanal bzw. die Trennkartusche ausgewechselt werden. Dadurch erhöht sich die Produktivität deutlich.

Die HF5 ist diejenige Methode in der Fluss-FFF-Familie, welche eine hohe Trennleistung mit geringer Probenverdünnung und damit hoher Nachweisempfindlichkeit der Detektion verbindet. Aus diesen Stärken ergeben sich naturgemäß auf der anderen Seite die Limitationen der HF5. Der kleine Kanal bietet wenig Platz und wird bei zu hoher Probenbeladung Überladungseffekte zeigen. Es ist deshalb wünschenswert, die HF5 als zusätzliche Methode zur Verfügung zu haben, ohne auf die Flachkanal Fluss-FFF (AF4) verzichten zu müssen.

In diesem Beitrag wird ein System für die Feldfluss-Fraktionierung vorgestellt, das sowohl mit AF4- als auch mit HF5-Trennkanälen betrieben werden kann [11]. Es erlaubt, von nur einem Instrument gesteuert, den flexiblen Wechsel zwischen den beiden Trennmodi. Außerdem zeigen wir innovative Problemlösungen auf, mit denen bislang limitierende Eigenschaften der HF5 verbessert werden konnten. Durch die hier vorgestellte Entwicklung eines völlig neuen Konstruktionsprinzips wird der routinemäßige Einsatz der HF5 ermöglicht und die Leistungsfähigkeit der Fluss-FFF einem breiten Anwenderkreis zugänglich. Kurz gesagt: die Feldflussfraktionierung ist damit nicht aufwändiger als eine HPLC-Trennung.



Abbildung 2: Hohlfaser-Kartusche (HF5-Kanal, siehe Text)

Der in Abb. 2 gezeigte HF5-Kanal stellt eine Neukonstruktion dar (zum Patent angemeldet). Das Gehäuse ist 17cm lang und besitzt neben einer Reihe von Dichtungselementen zwei Fittings für den Anschluss an die Flusssteuerung durch das Eclipse-Instrument. Die Kartusche ist für einen Maximaldruck von 30bar ausgelegt. Das verwendete Hohlfaser-Element besteht aus Polyethersulfon, hat einen Innendurchmesser von 0,8mm und ist in 10 und 30kDa-Ausschlussgrenzen erhältlich. Diese Kartusche besitzt - zusätzlich zum Cross-Flow Auslass - jeweils eine Einlass- und eine Auslassöffnung wie eine Chromatographiesäule.

Der AF4 - Kanal

Im Unterschied zur Hohlfaser-Technologie werden bei konventionellen AF4-Kanälen drei Flussanschlüsse benötigt: Einlass, Auslass und Injektionspunkt [12]. Um das Umschalten zwischen beiden Trennmodi zu vereinfachen, wurde ein völlig neuer AF4-Kanal entwickelt. Dieser besitzt wie die HF5-Kartusche nur zwei Anschlussöffnungen. Die Injektion der Probe erfolgt mit der mobilen Phase über den Einlass. Es wird keine Spacerfolie verwendet. Der Flussraum, in dem die Trennung stattfindet, ist stattdessen in die obere Platte des Kanals eingebracht.

Ein kritischer Punkt, der in der Vergangenheit für Probleme sorgte, ist die zuverlässige Abdichtung des Kanals gegenüber der Membran, um das Austreten von Flüssigkeit bzw. Probe längs der Kanalwände zu verhindern. Dies wird im neuen Kanal mit Hilfe einer speziell konstruierten Dichtfläche erreicht (zum Patent angemeldet), die gegenüber herkömmlichen Konstruktionen mit Spacerfolien weniger Anpressdruck benötigt. Durch diese Technik lassen sich auch Kanäle mit großer Grundfläche abdichten, die beispielsweise für semi-präparative Trennungen geeignet sind.

F4 Steuerungssystem für Kanal und Hohlfaser

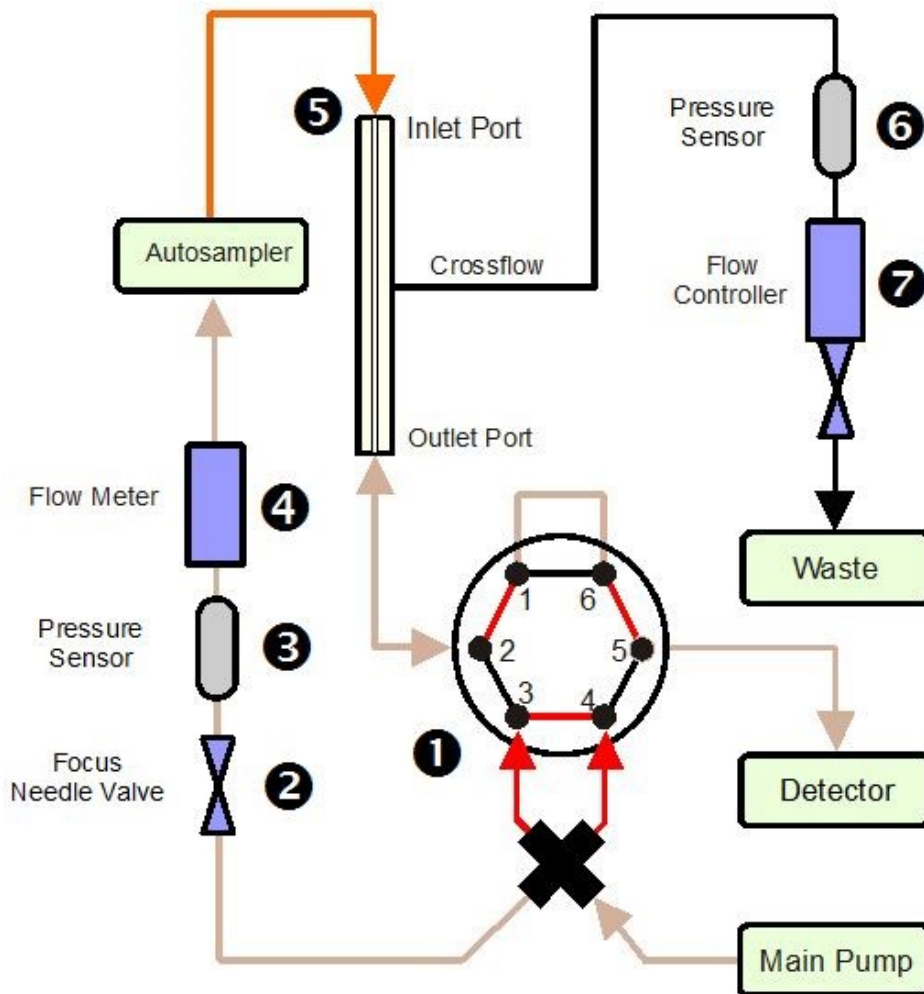


Abbildung 3: Schema des neuen F4-Steuerungssystems

Abbildung 3 zeigt ein Schema des neuen F4-Steuerungssystems, das mit beiden Kanälen – AF4 und HF5 – im Wechsel betrieben werden kann.

Das 6-Kanal-Ventil (1) regelt die Umschaltung zwischen Fokus- und Elutions-Modus. Beim Fokussieren wird der Fluss in zwei Teile aufgeteilt. Diese treten in die entgegengesetzten Öffnungen des Kanals ein (5). Ein Flussmessgerät (4) bestimmt die Flussrate in Richtung Kanaleinlass, die daraufhin von einem Einstellventil (2) auf einen definierten Wert reguliert wird. Dadurch wird automatisch die Flussrate am Ausgang des Kanals festgelegt. Der Quotient aus beiden Flussraten determiniert die Position der Fokuszone. Dieser Wert lässt sich einstellen, so dass der Fokus exakt platziert werden kann. Dadurch entfällt die bisher gebräuchliche und sehr aufwändige Prozedur, mit der die Lage des Fokus durch Injektion einer gefärbten Probe (üblicherweise Dextranblau) in einem Kanal mit transparenter Deckelplatte ermittelt werden musste. Bei HF5-Anwendungen lässt sich der Fokusbereich wahlweise nach dem Kartuschenwechsel oder sogar für jede Separation individuell platzieren und in der Breite variieren. Während der abschließenden Elutionsphase übernimmt ein zweites Flussmessgerät mit einem Einstellventil (7) die Regulation von Kanal- und Querfluss.

Weitere Instrumente

In dieser Studie wurden außerdem noch benutzt: HPLC von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) mit einem Degasser Agilent 1100, eine isokratische Pumpe Agilent 1100, ein Auto Sampler Agilent 1200 sowie ein Agilent 1100 (VWD) Detektor.

Ein DAWN HELEOS II 18-Winkel Lichtstreuendetektor (MALS-Detektor) und ein Differenzial-Refraktometer Optilab rEX (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, USA) kamen ebenfalls zum Einsatz.

Alle weiteren Informationen zu Material und Methoden sind in der folgenden Publikation zu finden: Christoph Johann, Stephan Elsenberg, Ulrich Roesch, Diana C. Rambaldi, Andrea Zattoni, Pierluigi Reschiglian "A novel approach to improve operation and performance in flow field-flow fractionation" Original Research Article, Journal of Chromatography A, im Druck.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.077>

Ergebnisse und Diskussion:

Um die Trennleistung und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden 100 Trennläufe mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) nacheinander auf demselben HF5-Modul durchgeführt.

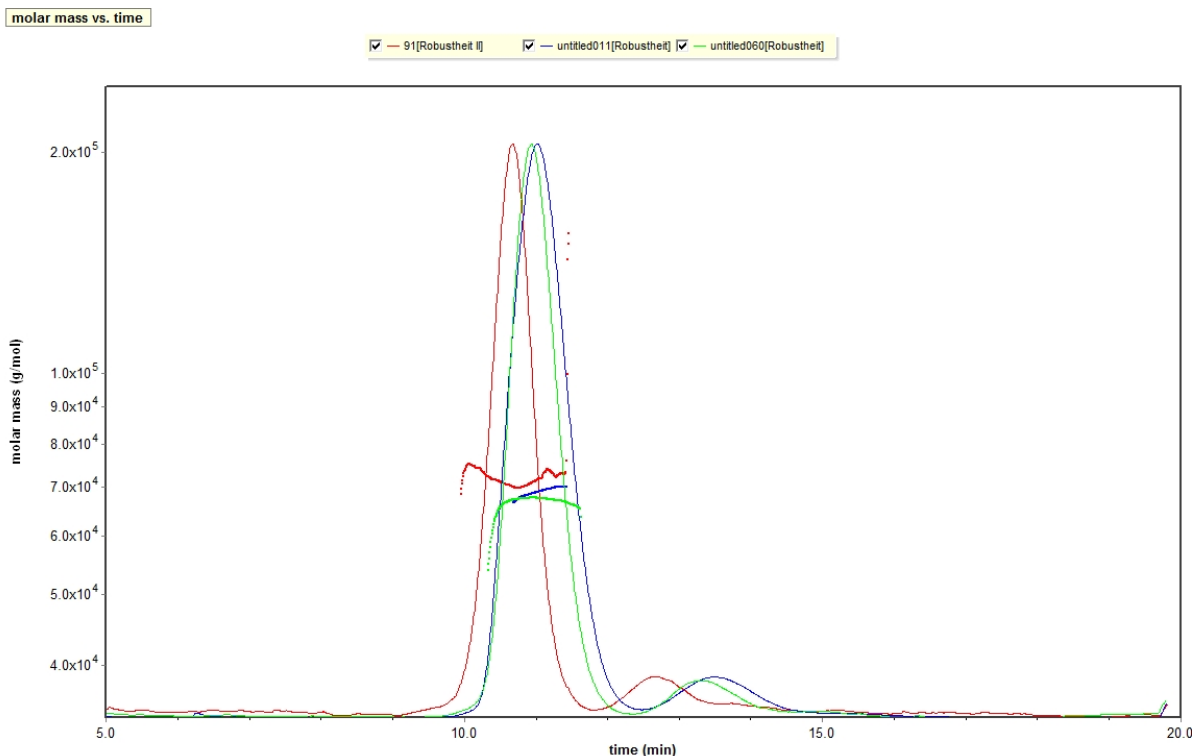


Abbildung 4

Exemplarisch sind in Abbildung 4 die Fraktogramme aus dem 11. (blau), dem 60. (grün) und dem 91. (rot) Lauf aufgetragen.

Die mittels Lichtstreuung gemessenen Molmassen aus den eluierten Fraktionen sind dort ebenso dargestellt. Sie stimmen mit dem zu erwartenden Wert von 67kDa sehr gut überein. Auch nach 100 Injektionen ist die Effizienz der Trennung unverändert gut. Gleichwohl kann man einen Trend zu geringfügig kürzeren Elutionszeiten und etwas engeren Peaks erkennen. Dies lässt sich möglicherweise auf eine leichte Veränderung der Membrancharakteristik zurückführen.

Die Ergebnisse belegen die Tatsache der geringeren Probenverdünnung, wodurch eine höhere Nachweisempfindlichkeit ermöglicht wird (Abb. 5). Gezeigt ist die Höhe des UV-Signals als Funktion der Aufgabemenge des Enzymproteins Carboanhydrase (CAH) im Vergleich zwischen HF5 und zwei verschiedenen AF4 Kanälen, SC und LC. Die Kanalhöhe ist vergleichbar (HF5 Radius 400µm, Kanalhöhe der AF4 Kanäle 350µm). Aufgrund des geringen Kanalvolumens sind die Peaks nach der HF5 Trennung um den Faktor 4 bzw. 6 höher.

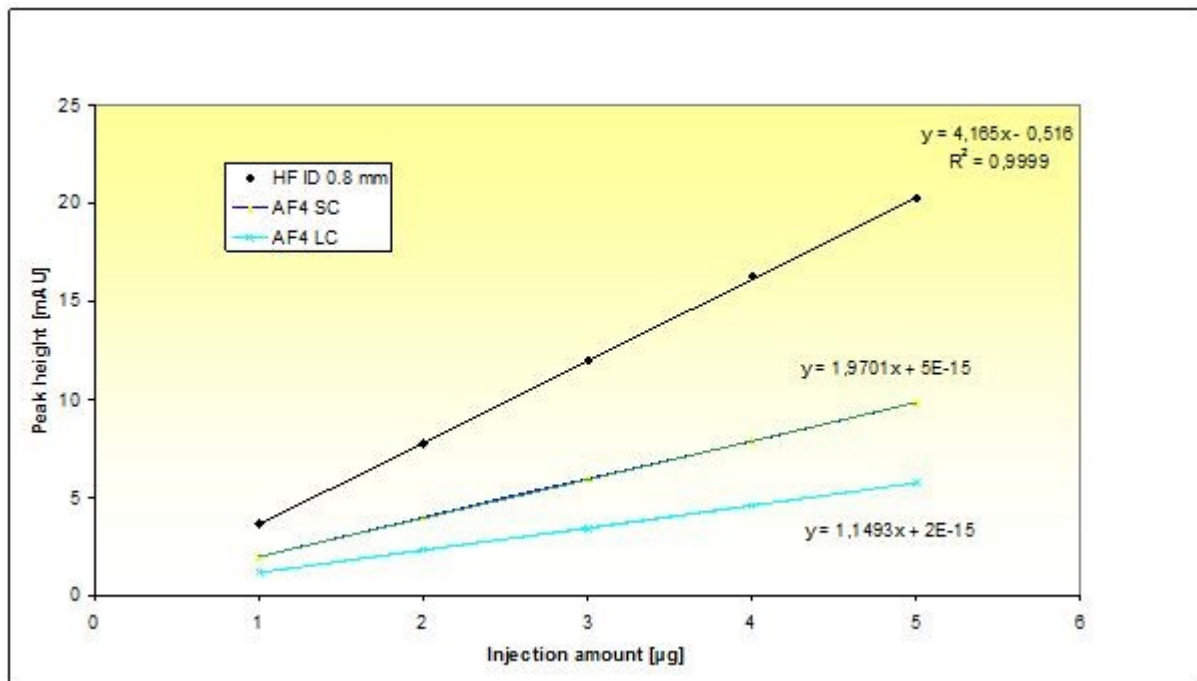


Abbildung 5

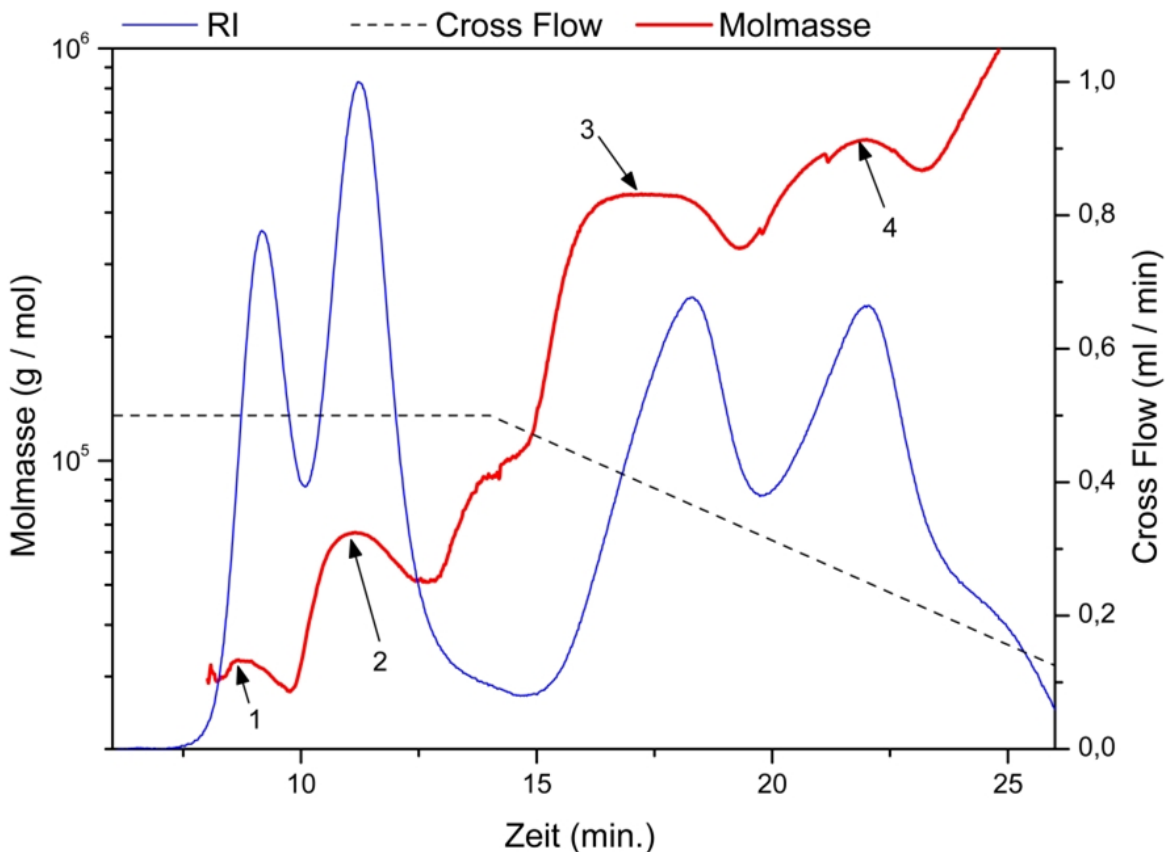


Abbildung 6

Abbildung 6 zeigt das resultierende Fraktogramm mit den RI-Signalen und den Molmassen, die mit dem MALS-Detektor bestimmt wurden. Obwohl keine vollständige Basislinientrennung erfolgte, wurde bei den Molmassen eine bemerkenswerte Genauigkeit erzielt. Gegenüber bisher publizierten Daten zeigt sich eine signifikante Verbesserung der Trennleistung [3]. Die Reproduzierbarkeit war ebenfalls gut (Daten hier nicht gezeigt).

Die theoretischen Grundlagen der FFF-Trennung sind sehr detailliert beschrieben. Daher lässt sich das Trennergebnis (Fraktogramm) vorhersagen, wenn die Größe der Probenbestandteile vorgegeben ist. Umgekehrt kann man aus der experimentellen Retentionszeit die Größe der jeweiligen Fraktion berechnen. Dieser Zusammenhang kann zur Methodenentwicklung genutzt werden. Dazu hat Wyatt Technology unter der Bezeichnung „ISIS“ eine Software entwickelt, die es auch einem unerfahrenen Anwender leicht macht, die für den jeweiligen Fall optimale Trennmethode zu erarbeiten.

Schlussfolgerungen:

Die Resultate aus dieser Studie machen deutlich, dass die HF5 mit dem hier vorgestellten System eine ebenso gute Trennung zeigt wie die bereits bewährten AF4 Kanäle. Die Vorteile der HF5 in Bezug auf hohe Sensitivität können ohne Einbußen bei der Effektivität ausgeschöpft werden. Der HF5 Kanal kann sehr einfach mit geringen Kosten gegen einen neuen ausgetauscht werden, es

ist nicht erforderlich, den Kanal auseinanderzubauen und eine Membran zu wechseln. Das neue F4-System, das hier vorgestellt wird, zeichnet sich gegenüber literaturbekannten Instrumenten durch eine Reihe besonderer Eigenschaften aus:

1. Es wird nur eine Pumpe benötigt.
2. Der Querfluss wird mit einem Flussmessgerät anstelle einer zusätzlichen Pumpe reguliert.
3. Die Fokusposition wird auf neuartige Weise festgelegt; das unbeabsichtigte „Wandern“ des Fokus in einen suboptimalen Bereich wird verhindert, und der Fokus kann je nach Methodenwahl angepasst oder verschoben werden;
4. Das Konstruktionsprinzip erlaubt eine kostengünstige Herstellung des HF5 Kanals in hohen Stückzahlen und ermöglicht eine Einwegverwendung (steril, kontaminationslos); Kartuschenwechsel innerhalb von Sekunden
5. Automatisiertes Umschalten auf den AF4-Kanal ist in einem Gerät realisiert. Der neu entwickelte AF4-Kanal hat nur zwei Anschlüsse und ist damit kompatibel mit der HF5.
6. Sind zwei HF5-Kartuschen angeschlossen, so kann durch Umschalten zwischen beiden unterbrechungsfrei gearbeitet werden, falls eine Kartusche verbraucht ist. Dies reduziert Standzeiten und steigert die Produktivität des Systems.
7. Mittels der ISIS Software können Trennmethode am Computer optimiert und von einer Kanalgeometrie zu einer anderen umgerechnet werden.

Damit bietet die neue Eclipse DUALTEC dem Anwender ein Höchstmaß an Sensitivität, Flexibilität und Produktivität.

Literatur:

- [1] Zattoni A, Rambaldi D, Reschiglian P, Melucci M, Krol S, Coto Garcia AM, Sanz-Medel A, Roessner D, Johann C., J Chromatogr A 1216:9106-9112 (2009)
- [2] M. van Bruijnsvoort, W. Th. Kok, R. Tijssen. Anal. Chem., Vol. 73, 4736-4742 (2001)
- [3] I. Park, K-J Paeng, D Kang, MH Moon, J. Sep. Sci. 28, 2043–2049 (2005)
- [4] WJ Lee, BR Min, MH Moon, Anal. Chem. 71, 3446-3452 (1999)
- [5] P. Reschiglian, B. Roda, A. Zattoni, B.R. Min, M.H. Moon J. Sep. Sci. 25, 490-498 (2002)
- [6] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, L. Cinque, D. Melucci, B. R. Min, M. H. Moon, J. Chromatogr. A 985, 519-529 (2003)
- [7] P. Reschiglian, A. Zattoni, L. Cinque, B. Roda, D. Melucci, F. Dal Piaz, A. Roda, M.H. Moon, B.R. Min. Anal. Chem. 76, 2103-2111(2004)
- [8] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, L. Cinque, D. Parisi, A. Roda, M. H. Moon, B. R. Min, F. Dal Piaz, Anal. Chem. 77, 47-56 (2005)
- [9] A. Roda, D. Parisi, M. Guardigli, A. Zattoni, P. Reschiglian, Anal. Chem. 78, 1085-1092 (2006)
- [10] A. Zattoni, D.C. Rambaldi, B. Roda, D. Parisi, A. Roda, M.H. Moon, P. Reschiglian, J. Chromatogr. A 1183, 135-142 (2008)
- [11] S. K. Ratanathanawongs Williams, D. Lee, J. Sep. Sci. 29, 1720 – 1732 (2006)
- [12] K.G. Wahlund , A. Litzen, J. Chromatogr 461, 73-87 (2009)