

## 2 Feld-Fluss-Fraktionierung

### 2.1 Einleitung

Die Trennung in der FFF wird in einem dünnen, bandförmigen Kanal durchgeführt. Senkrecht zum Eluensfluss wird ein Kraftfeld angelegt, welches mit den Probenmolekülen im Kanal wechselwirkt. Dieses Kraftfeld bewirkt, dass die gelösten/suspendierten Teilchen entgegen der „normalen“ Diffusion (konzentrationsbedingte Diffusion) in die Richtung einer Wand (Akkumulationswand) gezwungen werden. Je kleiner der Diffusionskoeffizient der Moleküle ist, desto geringer ist deren Rückdiffusion, welche gegen die äußere Kraft wirkt.

In Abhängigkeit von der Größe dieser Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Molekülspezies und dem externen Feld resultieren für die Teilchen charakteristische Gleichgewichtsabstände zu der Akkumulationswand. Dadurch werden die Teilchen in den verschiedenen Schichten des parabolischen, laminaren Eluensflusses unterschiedlich schnell durch den Kanal transportiert.

Die Wahl des eingesetzten Kraftfeldes richtet sich nach dem zu trennenden Probenmaterial und dessen Eigenschaften. Soll z. B. nach der Partikelladung getrennt werden, wird ein elektrisches Feld angelegt (Elektrische FFF).<sup>[49, 50]</sup> Große Partikel bzw. hohe Molekülmassen können mit der Sedimentations-FFF bestimmt werden.<sup>[51-55]</sup> Zur Bestimmung der Molekülgröße eignet sich die Fluss-FFF (Flow FFF)<sup>[25, 27, 31, 56-61]</sup>, bei der ein zweiter Eluensfluss, der aus dem gleichen Eluens besteht, senkrecht zum Kanal als Kraftfeld wirkt. Weniger bekannt sind die Konzentrationsgradienten-FFF<sup>[62]</sup>, die Magnetische FFF<sup>[63, 64]</sup> und die Scher-FFF<sup>[65]</sup>.

Zusätzlich zur Wahl des Trennfeldes besteht die Möglichkeit, den Aufbau der Partikelschicht an der Akkumulationswand zu kontrollieren. Bei der „normalen“ FFF wird durch die kraftfeldinduzierte Wanderung der Teilchen ein exponentielles Konzentrationsprofil gebildet, welchem die Diffusion entgegenwirkt. Dagegen werden bei der sterischen FFF die Moleküle in eine dünne, homogene Schicht in der Nähe der Akkumulationswand gezwungen.<sup>[66, 67]</sup> Hierbei spielt die Diffusion keine Rolle mehr und die Partikel werden aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens getrennt. Im Gegensatz zur „normalen“ FFF eluieren hier die großen Moleküle vor den Kleinen.<sup>[66, 68-71]</sup>

Die große Anwendungsbreite ist die Besonderheit der FFF.

Neben Verbindungen, die sowohl gelöst als auch suspendiert vorliegen, können Mikro- oder Makrogele<sup>[72-76]</sup> enthalten sein, die Proben aus Polymergemischen (Blends)<sup>[76]</sup> oder aus Polymer-Partikel-Zusammensetzungen<sup>[73, 75]</sup> bestehen, wässrige<sup>[77-80]</sup> oder organische<sup>[81-86]</sup> Eluentien eingesetzt werden, die Analyten geladen oder ungeladen sein, linear, verzweigt, statistisch geknüllt, globular oder kolloidal<sup>[72, 74, 79, 84, 85, 87, 88]</sup> vorliegen und einen natürlichen, synthetischen, industriellen oder geologischen Ursprung haben. Auch biologische Verbindungen wie Proteine, Bakterien, Viren und Zellen können ohne auftretende Degradation schonend untersucht werden.<sup>[16, 89-91]</sup>

Die verschiedenen FFF-Systeme lassen sich mit allen in der Chromatographie verwendbaren Detektoren verbinden. Die Kopplung mit konzentrations sensitiven Detektoren (ELSD, UV/VIS oder RI) und der Vielwinkellichtstreuung (MALLS)<sup>[25, 72, 74, 75, 92, 93]</sup> z. B., ermöglicht es, Aussagen über Molmasse, Größe und andere physikochemische Parameter der untersuchten Proben zu machen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden hauptsächlich MALLS und ELSD eingesetzt.

Für die genauere Bestimmung von komplexen Materialien mit mehreren Verteilungen können 2-dimensionale Messungen durch die Kopplung von verschiedenen Trennsystemen durchgeführt werden. So ergibt eine Verbindung von Sedimentations-FFF und Fluss-FFF die Größe-Dichte-Verteilung, z. B. von komplexen Kolloiden. Die Kopplung von ThFFF und Fluss-FFF oder SEC ermöglicht die Bestimmung der chemischen Zusammensetzungs-/Molmassenverteilung, z. B. von Blockcopolymeren.<sup>[94, 95]</sup>

## 2.2 Thermische Feld-Fluss-Fraktionierung

### 2.2.1 Apparativer Aufbau und Trennprinzip

In der ThFFF wird ein thermisches Feld senkrecht zu einem Kanal, der aus einem Abstandshalter (Spacer) aus Polyimid zwischen zwei hochpolierten Metallplatten gebildet wird, eingesetzt. Dieses Feld wird durch Beheizen der oberen und Kühlung der unteren Platte erzeugt (s. Abb. 1).

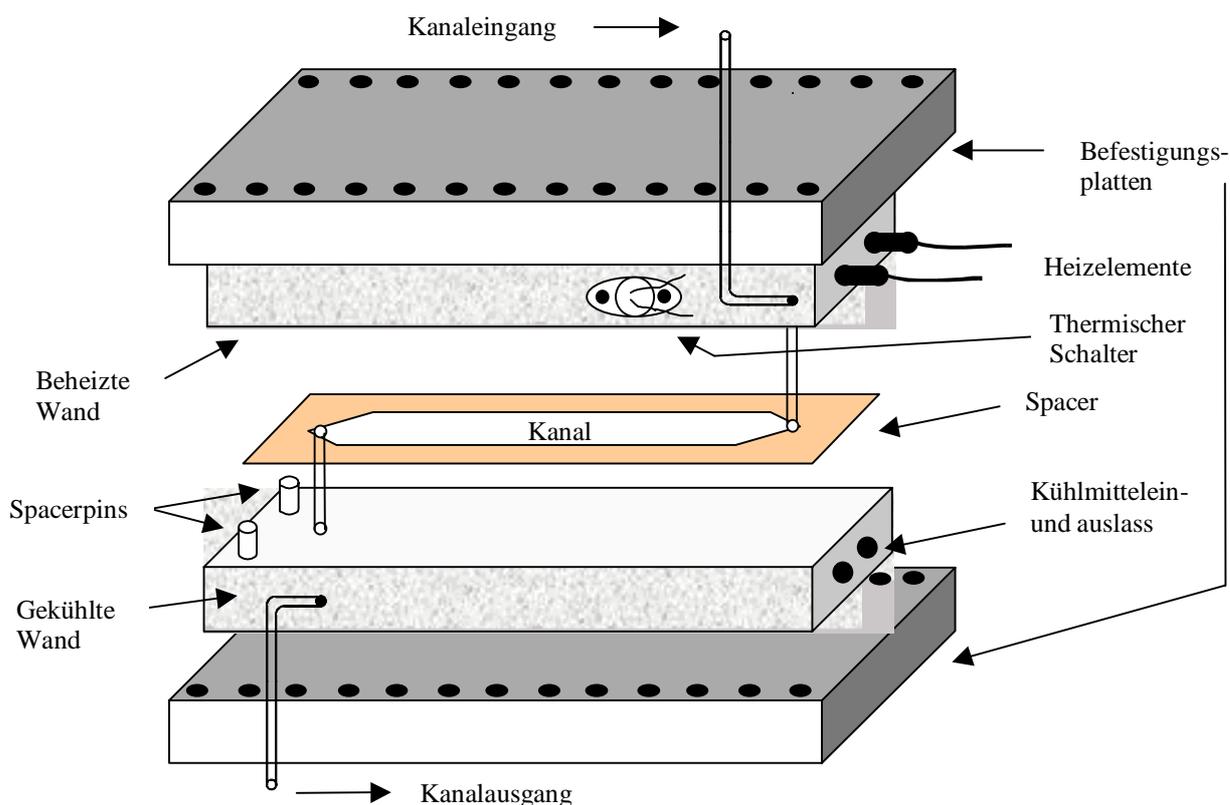


Abb. 1 Apparativer Aufbau der Thermischen Feld-Fluss-Fraktionierung

In diesem Temperaturgradienten wandern die Probeteilchen auf Grund der thermische Diffusion  $D_T$  in die Richtung der kühleren Wand (Akkumulationswand). Dies führt zur Entstehung eines Konzentrationsgradienten. <sup>[96]</sup>

Die konzentrationsbedingte, „normale“ Diffusion  $D$  ist diesem Konzentrationsgradient entgegengerichtet und nach einer gewissen Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den Kräften ein. Das führt zu einer Gleichgewichtsverteilung der gelösten Teilchen.

Die verschiedenen Werte der Größen  $D_T$  und  $D$  für die unterschiedlichen Moleküle, bzw. deren Quotienten  $D_T/D$ , führen zu unterschiedlichen Schichtdicken und Gleichgewichtsabständen zur Akkumulationswand. Sie sind für ein Polymer-Solvent-System charakteristisch, wobei  $D_T$  nahezu unabhängig von der Molmasse ist. [82, 83, 97, 98]

Die resultierende Schichtdicke  $l$  der Polymere mit gleicher chemischer Zusammensetzung, aber unterschiedlicher Molmasse, wird durch die Größe des Diffusionskoeffizienten, der von der Molmasse abhängig ist, bestimmt (s. Abb. 2).

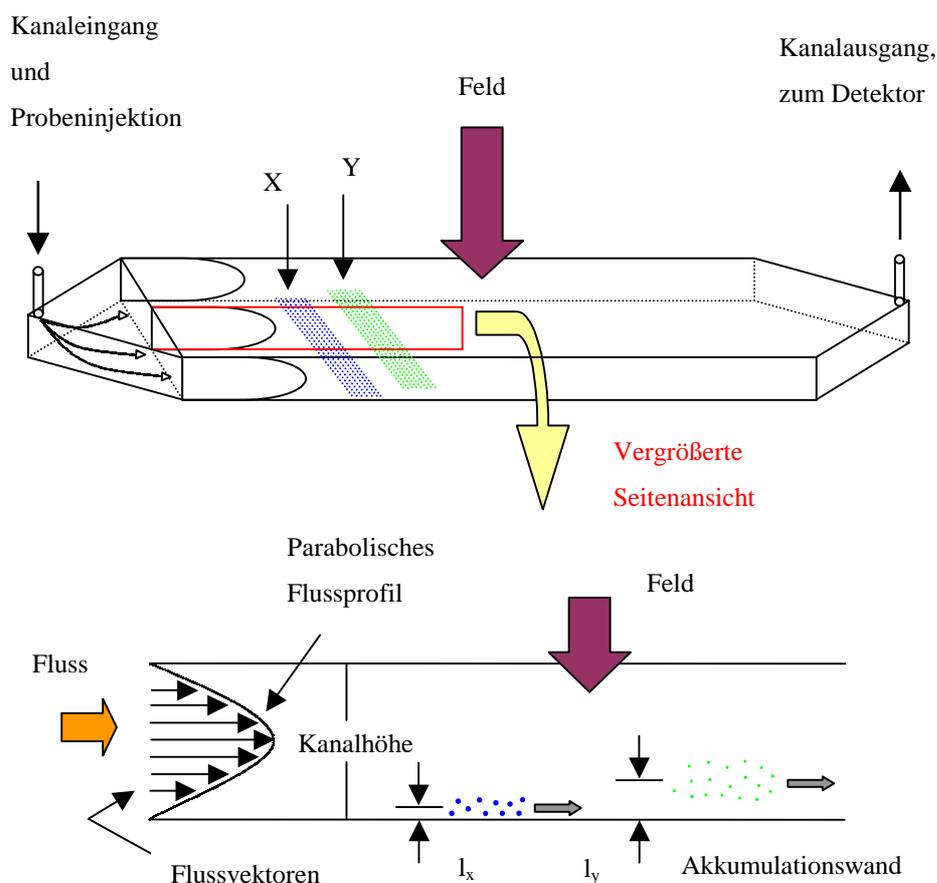


Abb. 2 Trennprinzip der Thermischen Feld-Fluss-Fraktionierung

Wenn die Beziehung zwischen der Diffusion  $D$  und der Molmasse  $M$  und die entsprechenden Parameter (z. B. Partikeldurchmesser, Viskosität) für ein Polymer-Solvent-System bekannt sind, stellt die ThFFF eine sehr gute Methode für die Bestimmung von Molmassen und -verteilungen sowie zur Ermittlung des thermischen Diffusionskoeffizienten  $D_T$  von Polymeren dar. [81, 82, 84, 96, 98-100]

Des Weiteren ist es mittels der ThFFF möglich, Aussagen über die chemische Zusammensetzung von Polymeren (z. B. von Copolymeren<sup>[94, 101-104]</sup> oder Polymerblends<sup>[76]</sup>) und deren Verteilung zu treffen.

Chemisch verschieden zusammengesetzte Polymermoleküle mit gleichen Molmassen nehmen auf Grund ihrer unterschiedlichen thermischen Diffusionskoeffizienten  $D_T$ , die von der chemischen Zusammensetzung abhängen, unterschiedliche Gleichgewichtsabstände zur Akkumulationswand ein. Durch das parabolische Geschwindigkeitsprofil des laminaren Kanalfusses kommt es dann zu einer zeitlich versetzten Elution der Moleküle. Sie können deshalb mit Hilfe der ThFFF nach ihren Funktionalitäten und -verteilungen getrennt werden.

### 2.2.2 Theoretische Grundlagen

Die theoretischen Grundlagen der ThFFF sind in einer Vielzahl von Veröffentlichungen detailliert dargestellt worden.<sup>[13, 17, 86, 105-107]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit soll daher nur auf einige grundlegende theoretische Betrachtungen eingegangen werden.

In der ThFFF wird die auf die Teilchen wirkende Kraft  $F$  des Feldes durch die „normale“ Diffusion, die thermische Diffusion und den gewählten Temperaturgradienten definiert:

$$F = kT \cdot \frac{D_T}{D} \cdot \frac{dT}{dx} \approx kT \cdot \frac{D_T}{D} \cdot \frac{\Delta T}{w} \quad (1)$$

$k$  = Boltzmann-Konstante

$T$  = Temperatur

$D_T$  = thermischer Diffusionskoeffizient

$D$  = Diffusionskoeffizient =  $\frac{kT}{6\pi\eta r}$  ( $\eta$  = Viskosität,  $r$  = hydrodynamischer Radius)

$w$  = Kanalhöhe

Die Separation beruht demnach auf der unterschiedlichen Größe des Quotienten aus Diffusions- und thermischen Diffusionskoeffizienten. Dieser Quotient wird als Soret-Koeffizient bezeichnet.<sup>[101]</sup>

Das Entgegenwirken von „normaler“ und thermischer Diffusion führt zu einem stationären Zustand, in welchem die Moleküle exponentiell im Kanal verteilt sind:

$$c = c_0 \cdot e^{-\frac{x}{l}} \quad (2)$$

$c$  = Konzentration im Abstand  $x$

$c_0$  = Konzentration an der Akkumulationswand

$x$  = Abstand von der Akkumulationswand

$l$  = charakteristische mittlere Schichtdicke des exponentiellen Konzentrationsprofils

Die Schichtdicke  $l$  kann dabei auch folgendermaßen beschrieben werden:

$$l = \frac{D}{U} = \frac{kT}{F} \quad (3)$$

$U$  = Partikelgeschwindigkeit, welche vom Feld induziert wird =  $\frac{D_T \Delta T}{w}$

Die Gleichung (3) zeigt erneut, dass die Kraft  $F$  des Feldes die Schichtdicke  $l$  und damit die Trennung bestimmt.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der dimensionslose Retentionsparameter  $\lambda$

$$\lambda = \frac{l}{w} = \frac{D}{U \cdot w} \text{ bzw. } \lambda = \frac{D}{D_T \Delta T}, \quad (4)$$

der mit der Retention  $R$  in folgendem Zusammenhang steht:

$$R = 6\lambda \left[ \cot\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 2\lambda \right] \quad (5)$$

Bei starkem Feld ist  $\lambda$  sehr klein und damit vereinfacht sich die Formel zu  $R = 6\lambda$ .<sup>[87]</sup>

$R$  lässt sich auch durch die Retentionszeit ( $t_r$ ) oder -volumen ( $V_r$ ) ausdrücken, wobei  $t_r$  proportional zu  $F$  ist. Unter Verwendung der Gleichungen (3) und (4) folgt daraus:

$$\frac{t_0}{t_r} = \frac{V_0}{V_r} = R = 6 \frac{l}{w} = 6 \frac{kT}{Fw} \quad (6)$$

$t_0$  = Totzeit

$V_0$  = Totvolumen

Die Retention ist aber nicht nur von der Art und Stärke des angelegten Feldes abhängig, sondern auch vom Betrag der Vektoren des laminaren Flusses im Kanal, dem Flussprofil.

In der ThFFF wird das Feld durch Beheizen der oberen bzw. Kühlen der unteren Platte gebildet. Da die Viskosität eines Lösemittels temperaturabhängig ist, hängt ihr Wert von dem im Kanal erzeugten Temperaturgradienten und somit auch von der Position im Kanal ab. Die damit verbundene Änderung der Eluentsviskosität von der heißen zur kalten Wand bewirkt eine unsymmetrische Verzerrung des parabolischen Flussprofils in Richtung der heißen Platte. Das hat zur Folge, dass auch die maximale Flussgeschwindigkeit aus der Mitte des Kanals verschoben wird (Abb. 3).<sup>[87, 107, 108]</sup>

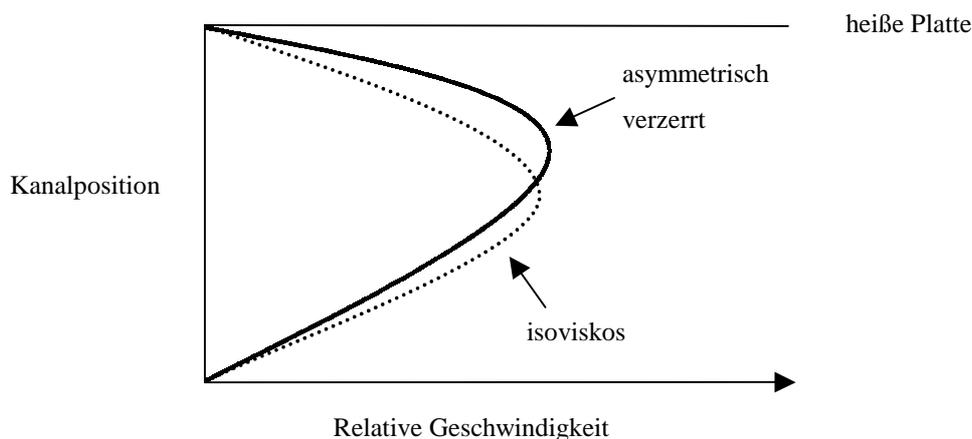


Abb. 3 Schematische Darstellung der asymmetrischen Verzerrung des Flussprofils

Durch die Verzerrung des Flussprofils und die Entstehung des Viskositätsgradienten verändert sich die Berechnung von  $R$  (und  $\lambda$ ). Ein Faktor, der die Abhängigkeit der thermischen Leitfähigkeit und Viskosität des Eluens vom Temperaturprofil im Kanal mit einbezieht, wurde von Giddings et al.<sup>[108]</sup> beschrieben.

Die meisten Moleküle einer injizierten Probe befinden sich bei angelegtem Feld jedoch in der Nähe der Akkumulationswand, so dass die Verzerrung des Flussprofils nur einen geringen Einfluss auf die Retention ausübt.

Zur Berechnung der Molekülparameter (z. B.  $D_T$ , Partikeldurchmesser) kann daher die Temperatur der kalten Wand eingesetzt werden.<sup>[109, 110]</sup> In neueren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auch unter Vernachlässigung aller Temperatureinflüsse gute Ergebnisse bei der Bestimmung des Soret-Koeffizienten erzielt werden können.<sup>[109, 111]</sup>

Werden Proben untersucht, die eine große Verteilung der Molmasse bzw. Partikelgröße aufweisen, ist es notwendig, während der Trennung das Trennfeld zu ändern. Dadurch bleiben die Analysenzeiten und Peakverbreiterungen begrenzt. Prinzipiell kann man neben der Änderung des Feldes<sup>[9, 52, 112-116]</sup> auch den Fluss<sup>[117]</sup> programmieren. Letzteres kann aber auf Grund der sich ändernden Flussrate zu inkonstanten Basislinien führen.

In der ThFFF werden daher vor allem zwei unterschiedliche Methoden der Feldprogrammierung eingesetzt. Zum einen die exponentielle Abnahme<sup>[113, 116]</sup> des Feldes während der Fraktionierung und zum anderen ein sogenanntes Power-Programm<sup>[112, 118]</sup>. Bei diesem Programm wird die Stärke des Feldes zu Beginn der Messung für einen bestimmten Zeitraum konstant gehalten und anschließend definiert verringert (Gl. 7). Die Änderung der Temperaturdifferenz ( $\Delta T(t)$ ) mit der Zeit  $t$  lässt sich mit folgender Formel (7) berechnen:

$$\Delta T(t) = \Delta T_0 \left( \frac{t_1 - t_a}{t - t_a} \right)^p \quad (7)$$

$\Delta T_0$  = Starttemperaturdifferenz

$t_1$  = Dauer des konstanten Feldes

$t_a$  = Programmparameter, der die Geschwindigkeit der Temperaturabnahme bestimmt

Der Parameter  $p$  ( $p = -t_a/t_1$ ) beschreibt die Form der Kurve der Temperaturabnahme.

In ausführlichen Studien konnte gezeigt werden, dass für das Power-Programm, im Gegensatz zur exponentiellen Abnahme des Feldes, bei  $p = 2$  eine nahezu lineare Elution mit konstanter Selektivität und Trennleistung über die gesamte Laufzeit gewährleistet wird.<sup>[112, 118]</sup>

Die Gleichung (7) kann aber nur dann eingesetzt werden, wenn die Anforderungen  $t \geq t_1 > t_a$  und  $p > 0$  gültig sind.

Zur Veranschaulichung der Temperaturdifferenzverläufe in Abhängigkeit vom Parameter  $p$  sind diese in Abb. 4 schematisch dargestellt.

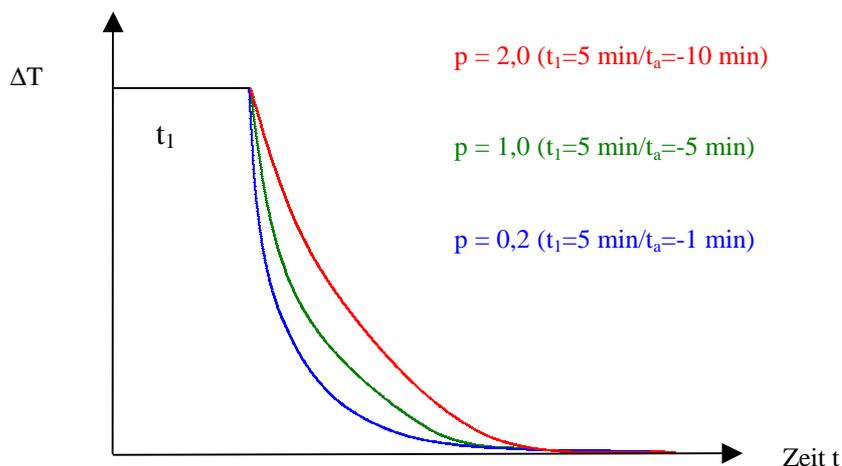


Abb. 4 Schematische Darstellung der Verläufe der Abnahme der Temperaturdifferenz

Wird eine Fraktionierung mit dem Power-Programm durchgeführt, muss die daraus resultierende Veränderung der Retention mit der Zeit berücksichtigt werden (Gl. 8):

$$t_0 = \int_0^{t_r} R dt \tag{8}$$

Ähnlich wie in anderen chromatographischen Trennmethode besteht in der FFF das Problem der Bandenverbreiterung, welche das Auflösungsvermögen beeinflusst. [18, 107, 119, 120]

Für reine Substanzen bildet sich ein Gaußsches Konentrationsprofil. Die Halbwertsbreite des Peaks (der Gaußverteilung) kann durch die Standardabweichung  $\sigma$  beschrieben werden. Ein weiterer Index für die Peakverbreiterung ist die Trennstufenhöhe  $H$  [105, 119]:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \tag{9}$$

$L$  = Länge des Kanals

In der FFF kann  $H$  durch

$$H = \frac{\chi(\lambda) * w^2 * V_r}{D} \tag{10}$$

beschreiben werden, wobei  $\chi$  eine komplizierte Funktion von  $\lambda$  ist. [86]

Bei großer Retention ( $\lambda \ll 1$ ) ergibt sich:

$$\chi = 24 \lambda^3 \quad (11)$$

Die Gleichungen (9), (10) und (11) machen die Notwendigkeit einer geringen Kanalhöhe  $w$  und Komprimierung der Moleküle in Schichten von minimaler Dicke  $l$  (und somit sehr kleinem  $\lambda$ , vgl. Gl. 4) deutlich. Dies führt zur Maximierung der Analysengeschwindigkeit und Reduzierung der Peakverbreiterung.<sup>[86]</sup>

## 2.3 Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

### 2.3.1 Apparativer Aufbau und Trennprinzip

Prinzipiell wird der Trennkanal in der AF<sup>4</sup> aus folgenden Bestandteilen gebildet:

Die Oberseite des Kanals besteht aus einer Teflon- (organische Eluentien) oder Glas-Platte (wässrige Systeme). Die Unterseite besteht aus Teflon, enthält jedoch eine eingelassene poröse Keramik-Platte mit aufliegender spezieller Trennmembran. Je nach Porenweite dieser Ultrafiltrationsmembran können verschieden große Probeteilchen analysiert werden und evtl. vorhandene niedermolekulare Bestandteile mit kleineren Radien vor der eigentlichen Trennung abgetrennt werden.

Die Form des Trennkanals wird durch die Struktur der oberen Platte vorgegeben (s. Abb. 5).

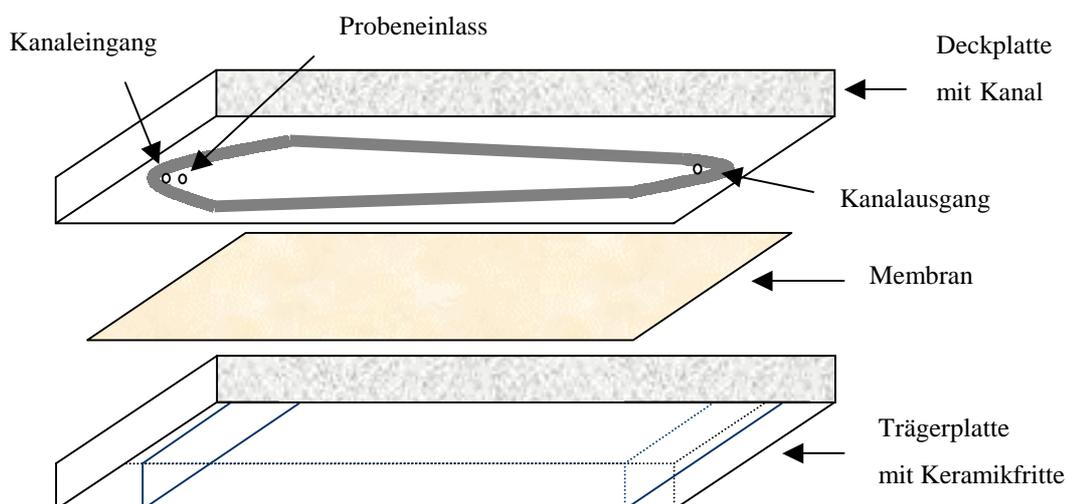


Abb. 5 Apparativer Aufbau der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

Das Trennfeld wird in der AF<sup>4</sup> durch einen zweiten Eluensfluss gebildet, der senkrecht zu dem Kanalfluss auf die Probeteilchen wirkt. Bei der AF<sup>4</sup> wird dieser Querfluss durch eine zusätzliche Pumpe erzeugt, die vom laminaren Fluss einen Anteil zur Erzeugung des Querflusses abzieht. Um die laminare Flussgeschwindigkeit bis zum Kanalende konstant zu halten, wird ein trapezoidal geformter Trennkanal eingesetzt. [20, 121-123]

Im Vergleich zu der symmetrischen Fluss-FFF, deren Ober- und Unterseite des Kanals aus zwei durchlässigen Fritten besteht, werden dadurch höhere Trennleistungen, bessere Auflösungen und Peakkapazitäten sowie durch Aufkonzentration der Probe ein verbessertes Signal-Rauschverhältnis erzielt.

Durch die Kraft des Querflusses wandern die Probeteilchen unter den Bedingungen der Stokesschen Reibung in die Richtung der unteren Platte mit aufliegender Membran. Dieser Bewegung ist die Diffusion entgegengerichtet. Nach einer gewissen Zeit (Relaxationszeit) stellt sich ein stationärer Zustand ein, in welchem die Probenmoleküle ihren Gleichgewichtsabstand zur unteren Platte erreicht haben. Die zu trennenden Makromoleküle diffundieren dabei je nach Molmasse bzw. Radius unterschiedlich schnell. Daraus ergeben sich unterschiedliche Abstände zur unteren Platte. Die resultierenden Positionen der Teilchen im parabolischen Flussprofil des laminaren Kanalstromes führen zu einer zeitlich versetzten Elution der Moleküle (Abb. 6).

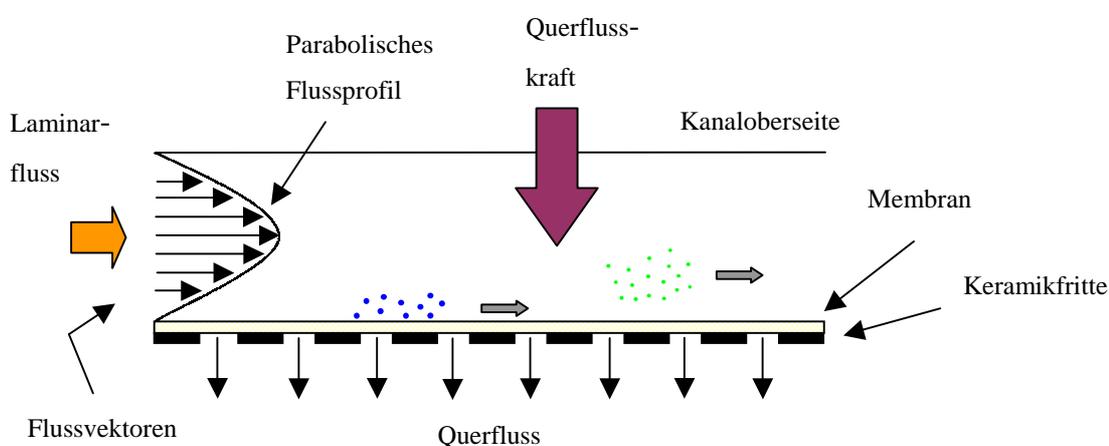


Abb. 6 Trennprinzip der Asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

Eine Trennung verläuft prinzipiell in vier Schritten: Injektion, Relaxation, Fokussierung und Fraktionierung.<sup>[27]</sup>

Im ersten Schritt wird während der Injektion gleichzeitig am Kanaleingang und -ausgang Eluens zugeführt. Die beiden Teilströme werden so zueinander eingestellt, dass sich ihre Fronten unterhalb des Probeneinlasses treffen und nach unten durch die Membran abfließen. Dabei wird die Probe gleichzeitig fokussiert und relaxiert. Während der Fokussierung wird die Probe zu einer Bande zusammenschoben und konzentriert. Anschließend wird der Eluensstrom am Kanaleinlass gestartet und die Fraktionierung beginnt.

Das Trennprinzip der AF<sup>4</sup> entspricht prinzipiell dem der ThFFF. Die Methoden unterscheiden sich jedoch durch die Art des angelegten äußeren Trennfeldes und die auf die Teilchen in Richtung der unteren Wand einwirkenden Kräfte (thermische Diffusion bzw. Stokessche Reibung).

Dadurch können je nach System Polymere nach verschiedenen molekularen oder chemischen Eigenschaften getrennt werden (in der ThFFF nach chemischer Zusammensetzung/Molmasse und in der AF<sup>4</sup> nach Größe).

In beiden Methoden wirkt die Diffusion der trennenden Kraft entgegen. Der Transport der Probenmoleküle im laminaren Kanalstrom mit parabolischem Flussprofil und die daraus resultierende Trennung, auf Grund unterschiedlicher Positionen (Geschwindigkeitsvektoren) im Kanalfluss, sind bei beiden Verfahren ebenso identisch.

### 2.3.2 Theoretische Grundlagen

Analog zu der Theorie der ThFFF wird in der AF<sup>4</sup> ein exponentielles Konzentrationsprofil der Teilchen im Kanal durch das anliegende Kraftfeld erzeugt. Die Dicke  $l$  der Schichten im stationären Zustand kann ebenfalls durch Gleichung (3) beschrieben werden.

Die auf die Teilchen wirkende Kraft des Feldes  $F$  wird in der AF<sup>4</sup> durch die Geschwindigkeit  $U$  des Querflusses und die Diffusion  $D$  bestimmt (Stokessches Reibungsgesetz):

$$F = \frac{kTU}{D} = 6\pi\eta rU \quad (12)$$

Die Partikelgeschwindigkeit  $U$  kann für die praktische Anwendung durch die volumetrische Querflussrate  $V_c$  ersetzt werden:

$$U = \frac{V_c}{bL} \quad (13)$$

$b$  = Kanalbreite

$L$  = Kanallänge

Für den Zusammenhang der Diffusion  $D$  mit dem Retentionsparameter  $\lambda$  ergibt sich somit folgende Gleichung:

$$D = \lambda \left( \frac{V_c}{bL} \right)^w \quad (14)$$

Die Retention  $R$  hängt mit dem Retentionsparameter  $\lambda$  analog zur ThFFF über Gleichung (5) zusammen. <sup>[21, 78]</sup>

Der erzeugte Querfluss, bzw. das an der Kanalunterseite abgezogene Eluens, bewirkt eine Verzerrung des parabolischen Flussprofils, analog zur ThFFF. Im Fall der AF<sup>4</sup> wird diesmal jedoch das Profil in die Richtung der Akkumulationswand verzerrt.

Zur Zeit ist nur eine Veröffentlichung bekannt, in welcher diese Verzerrung genauer untersucht wurde. <sup>[56]</sup> Es konnte bei Annahme eines parabolischen Flussprofils gezeigt werden, dass bei der Bestimmung der Retention  $R$  und des Parameters  $\lambda$  der Fehler kleiner als 1% ist.