

Системы проточного фракционирования макромолекул и наночастиц в поперечных полях

А. С. Лермонтов, к. х. н., «Соктрейд Ко», Москва
В. В. Родченкова, к. ф.-м. н., НИУ МАИ, Москва
 asl@soctrade.com

УДК 543+54.07

Описан принцип действия аналитических систем на основе проточного фракционирования частиц в поперечных полях различной природы. Представлена история метода, механизмы проточного фракционирования в асимметричных потоках, электрическом и гравитационном полях, под действием центробежных сил, а также в условиях градиента температуры. Обсуждаются особенности и возможности, области применения и объекты исследования каждой модификации метода. Описано комплексное решение компании Postnova Analytics – платформа FFF (Field-Flow Fractionation) для проточного фракционирования частиц в поперечных полях, в которой интегрированы модули для разделения, детекторы, системы для стабилизации температуры и другие компоненты под единым программным управлением.

Бурное развитие нанотехнологий и исследований различных природных и синтетических нанообъектов стимулирует увеличение потребности в методах разделения и анализа макромолекул и наночастиц, которые важны для исследований в области биохимии и биофизики, макромолекулярной химии, порошковых технологий, для экологического мониторинга объектов окружающей среды (почв, донных отложений, природных вод). Один из подходов, обеспечивающих разделение частиц по размеру и некоторым другим свойствам, реализуется в семействе методов поточного фракционирования в поле внешних сил, история успешного применения которого насчитывает более полувека [1, 2].

ПРИНЦИП ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ЧАСТИЦ В ПОТОКЕ

Фракционирование наночастиц в потоке под действием поля внешних сил (Field-Flow Fractionation, FFF) – это совокупность различных методов, в которых под действием полей различной физической природы происходит разделение движущихся частиц по размерам и некоторым другим параметрам. Как правило, поле направлено перпендикулярно ламинарному потоку внутри канала и прижимает частицы к стенке, противодействуя их диффузии и равномерному распределению по всей толщине канала. Каждое поле, в зависимости от своей природы, действует по-разному, например, центробежные силы

зависят от массы, поэтому легкие частицы вылетают из канала быстрее, чем тяжелые. На выходе из канала фракционирования с помощью соответствующего детектора регистрируется фрактограмма (по аналогии с хроматограммой в хроматографии), на которой хорошо видны пики частиц или макромолекул по размеру или по какому-либо другому признаку. Метод FFF обеспечивает высокое разделение при разделении любых твердых частиц размером от 1 нм в жидкой среде.

На сегодняшний день коммерчески доступны следующие методики, основанные на применении асимметричных потоков, электрического, гравитационного и термических полей, а также поля центробежных сил:

- фракционирование наночастиц и макромолекул в асимметричных потоках (AF4, Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation). Разделение только по размеру в диапазоне от 1 до 1000 нм или от 1 до 10 000 кДа;
- фракционирование наночастиц в потоке в седиментационном / центробежном поле (SedFFF, Sedimentation Field-Flow Fractionation). Разделение по размеру и плотности в диапазоне от 10 нм до 100 мкм;
- фракционирование макромолекул в потоке в термическом поле (TFFF, Thermal Field-Flow Fractionation). Разделение по размеру и по химической природе макромолекул в диапазоне от 1 до 10 000 кДа;
- фракционирование наночастиц и макромолекул в асимметричном потоке с наложением

электрического поля (ЕАF4). Разделение по размеру и заряду частиц (дзета-потенциалу) в диапазоне от 1 до 1000 нм или от 1 до 10 000 кДа;

- фракционирование микрочастиц в гравитационном поле с разделением потоков (SPLITT). Разделение по размеру и массе в диапазоне от 1 до 100 мкм.

ОТКРЫТИЕ МЕТОДА И СОЗДАНИЕ ПРИБОРНОГО ПАРКА ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИК ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

В 1966 году профессор Кальвин Гиддингс из университета штата Юта в Солт-Лейк-Сити открыл и запатентовал метод фракционирования частиц в потоке под действием внешнего поля [3–5]. За исследования в этой области ученый был дважды номинирован на Нобелевскую премию. Глубокая теоретическая проработка и ряд удачных опытных образцов и прототипов будущих приборов вызвали среди научной общественности интерес к новому методу, наметились перспективы коммерческого успеха. Научная группа под руководством профессора К. Гиддингса организовала в 1986 году компанию под названием FFFractionation, которая приступила к разработке и выпуску первых приборов.

Новая эра метода FFF наступила с появлением первой коммерческой автоматической системы фракционирования частиц в асимметричных потоках – Asymmetric Flow FFF (AF4), которую разработал в 1995 году в Техническом университете Мюнхена профессор Т. Кляйн. В 1997 году он основал компанию Postnova Analytics, которая после вывода первого прибора HRFFF 10000 на рынок стала законодателем мод в области фракционирования наночастиц, сменив в этом качестве компанию FFFractionation – главного инициатора продвижения технологий и обладателя множества решений и патентов. В 2001 году Postnova Analytics приобрела FFFractionation вместе с запатентованной технологией, ноу-хау и оригинальными трудами основателя метода профессора К. Гиддингса, преобразовав ее в свой американский филиал – Postnova Analytics USA. Продукция объединенной компании вышла на новый уровень по производительности, чувствительности, надежности и гибкости. Основная философия оборудования Postnova – модульность, позволяющая легко преобразовать один метод фракционирования в другой за счет замены канала, а не всего прибора. Для приборов асимметричного фракционирования допустима установка колонок ГПХ (гель-проникающая хроматография), поскольку системы ввода и детекторное обеспечение для обоих методов перекрывается. Собственное программное обеспечение NovaFFF универсально и способно не только управлять фракционированием, но собирать и обрабатывать данные с детекторов, включая 21-угловой детектор статического светорассеяния собственного производства.

СИСТЕМЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ В АССИМЕТРИЧНЫХ ПОТОКАХ AF4 И С НАЛОЖЕНИЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ ЕАF4

Технология разделения частиц в потоке насчитывает более 20 лет. Первый прибор разработан и выпущен в 1986 году. В 2004 году представлена система с контролем и стабилизацией температуры (для трех интервалов температур, в том числе высоких), а в 2011 году появились мембранные трубчатые каналы (HF5).

В настоящий момент выпускается серия модулей AF2000 MultiFlow FFF (AF4): AF2000 AT – комнатная температура; AF2000 MT – температура от 5 до 90 °С, AF2000 HT – температура от 20 до 220 °С, а также AF2000 (HF5).



Рис. 1. Система проточного фракционирования в асимметричных потоках AF2000 MultiFlow FFF (AF4)

Следует отметить, что температура сама по себе практически не влияет на процесс разделения, но часто для стабилизации условий и состояния разделяемых объектов требуется поддерживать определенный температурный режим. Высокотемпературная версия системы предназначена для синтетических и природных макромолекул, которые не растворяются при низкой температуре, например, для сверхвысокомолекулярного полиэтилена [6].

В современной системе AF2000 MultiFlow FFF (AF4) (рис. 1) разделение происходит в плоском (толщина 350 мкм) канале, на дне которого установлена сменная мембрана с фиксированным размером пор (от 300 Да до 10 кДа). Поры настолько малы, что не пропускают частицы образца. В такой канал направляется ламинарный поток раствора с исследуемым веществом, часть растворителя просачивается через мембрану, прижимая к ней частицы или макромолекулы образца. На начальной стадии через мембрану пропускается весь поток, а частицы образца концентрируются в узкой полоске в начале канала. Для запуска разделения отбрасываемый поток уменьшают, а все частицы и макромолекулы постепенно распределяются по размерам и выходят из канала на детектор в порядке их возрастания (рис. 2). Так как скорость диффузии и прижимная сила зависят не от массы, а от размера частиц, то разделение происходит по их гидродинамическому радиусу [7–9]. Возможность регулирования прижимной силы путем тонкой настройки скоростей потоков выгодно отличает систему AF4 от ГПХ/ЭХ, где подобная корректировка выполняется только за счет подбора соответствующей колонки [10]. Доступны различные материалы мембран: целлюлоза, полимеры, нержавеющая сталь. Это позволяет использовать как жесткие смеси органических растворителей для синтетических полимеров, так и буферные, кислые или щелочные растворы для природных и биохимических наночастиц.

Модификация AF2000 (HF5) отличается формой канала – он представляет собой полую мембранную трубку, к стенкам которой прижимаются все частицы. Фракционирование в полых трубчатых мембранах в первую очередь подходит

для белков и других ценных биохимических объектов, поскольку полезная загрузка трубки невелика [11]. Смена мембраны невозможна, что подразумевает проведение только однотипных разделений. Важным отличием каналов HF5 является их стандартизация и возможность валидации для целей фармацевтики.

В конце 2017 года разработан новый модуль EAF4, в котором между мембраной и верхней стенкой канала с помощью двух электродов – анода и катода – ламинарный поток частиц подвергается действию поперечного постоянного или переменного электрического поля (рис. 3). Движение частицы в такой системе зависит от ее заряда (дзета-потенциала), а также от направления и напряженности поля. С помощью новой технологии Postnova EAF4 можно определять дзета-потенциал исследуемых частиц. Модуль интересен как для метрологии дзета-потенциала, так и для решения биохимических и медицинских задач, поскольку изменения дзета-потенциала различных макромолекул и микроорганизмов – это важнейший параметр, характеризующий проницаемость стенок клеточных мембран.

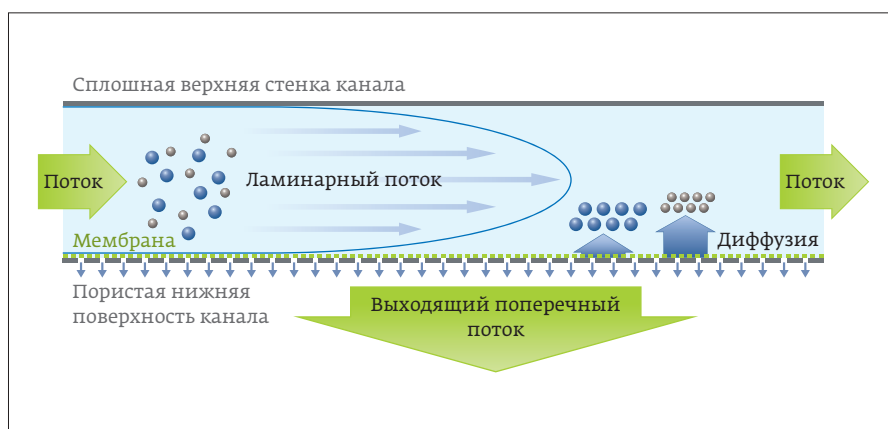


Рис. 2. Схема проточного фракционирования частиц в ассиметричных потоках

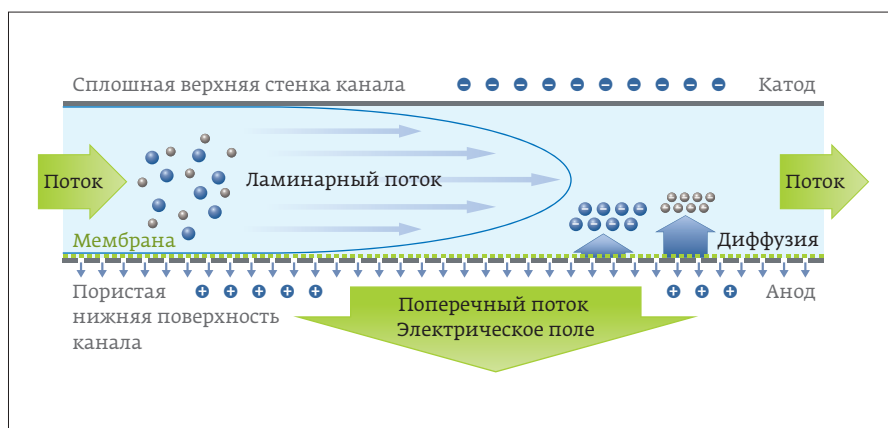


Рис. 3. Схема разделения частиц в ассиметричных потоках в электрическом поле



Рис. 4. Система проточного фракционирования частиц в поперечном поле центробежных сил CF2000 Centrifugal FFF (CF3)

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ В ПОТОКЕ В ПОЛЕ ЦЕНТРОБЕЖНЫХ СИЛ

Явление седиментации лежит в основе ряда методов фракционирования микрочастиц по размерам. Однако силы тяжести для этого недостаточно, а центробежная сила значительно увеличивает скорость оседания наночастиц. В 2010 году компании Postnova удалось создать коммерческую модель центрифуги CF2000 (CF3) (рис. 4), в которой канал вращается вместе с ламинарным потоком и частицами в нем (рис. 5).

Система центробежного фракционирования с высоким разрешением разделяет наночастицы, начиная от 15 нм, а при высокой плотности, например, в гелях золота и серебра – от 7–8 нм. Причем можно разделять одинаковые по размеру частицы разной природы, которые различаются по массе. Порядок выхода частиц – от мелких к большим

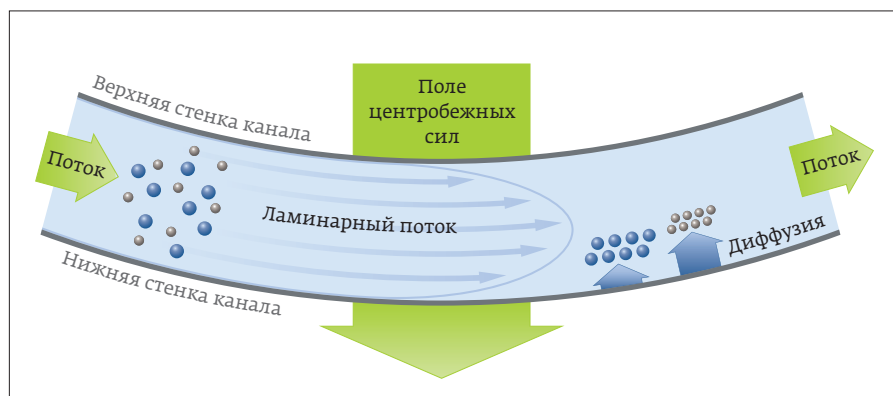


Рис. 5. Схема канала для фракционирования частиц в поле центробежных сил

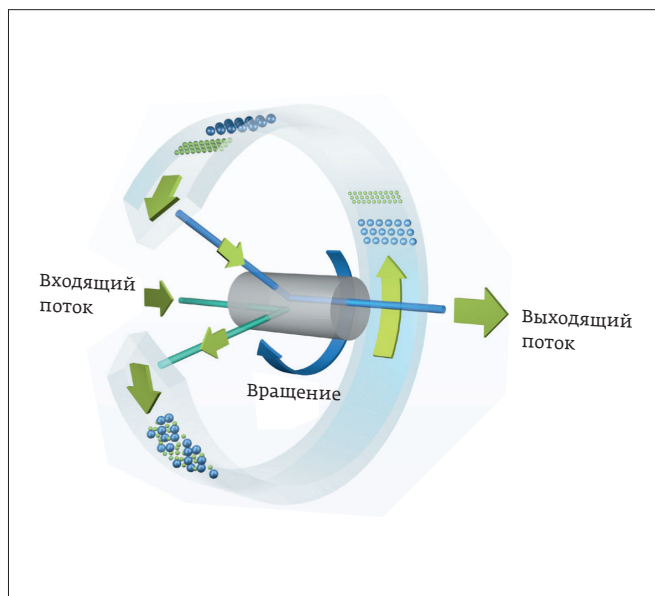


Рис. 6. Механизм разделения частиц в поле центробежных сил

(рис. 6). Обычно скорость вращения центрифуги составляет около 2500 об/мин, однако, для увеличения разрешения между фракциями частиц разных размеров и расширения их диапазона можно воспользоваться предусмотренным градиентным уменьшением скорости вращения. Метод достаточно удобен и даже позволяет набирать небольшие количества отдельных фракций для их дальнейшего анализа лабораторными методами, что полезно при отработке технологий создания определенных наночастиц или при исследованиях сложных природных объектов, например, илистых отложений или образцов, отобранных из окружающего воздуха [12]. Для биомолекул – это в первую очередь метод исследования агрегации, так как центробежные силы, равно как и асимметричные потоки, не оказывают никакого действия на самые неустойчивые агрегаты [13].

ПРОТОЧНОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ В УСЛОВИЯХ ГРАДИЕНТА ТЕМПЕРАТУРЫ

Макромолекулы полимеров подвержены термодиффузии, эффективность которой зависит от их пространственной структуры и химической природы. Явление термодиффузии заключается в том, что градиент температуры в однородной смеси приводит к возникновению разности концентраций легких и тяжелых компонентов

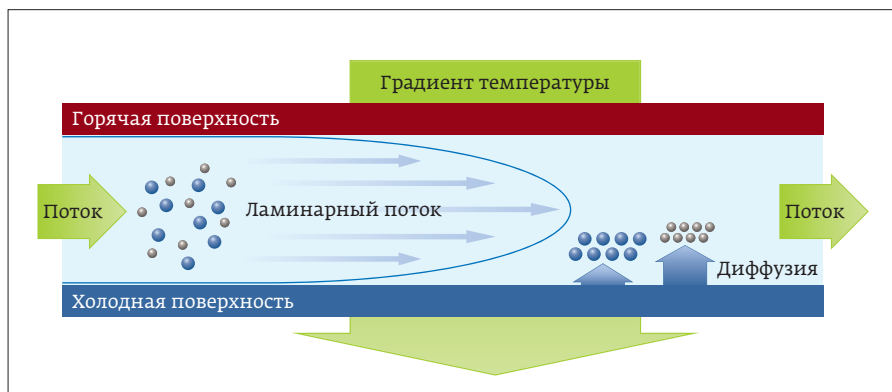


Рис. 7. Схема разделения частиц в потоке под действием градиента температуры в канале

в направлении падения температуры (рис. 7). Поле градиента температуры может быть эффективным при разделении макромолекул различного размера и природы – это предположение высказал и доказал экспериментально профессор К. Гиддингс [2–5]. Впоследствии этот принцип лег в основу приборного решения по разделению макромолекул и полимерных частиц компании FFFractionation. Компания Postnova Analytics его усовершенствовала и создала систему TF2000 Thermal FFF (TF3) (рис. 8). Полимеры при наличии градиента температуры подвергаются термодиффузии, разделяясь как по молярной массе, так и по химическому составу. Скорость диффузии зависит от массы, среднего размера и формы наночастиц, что дает возможность разделения частиц различных полимеров одинакового размера, недоступное иными способами (AF4 или ГПХ). Это, в свою очередь, открывает путь к решению актуальных задач сопоставления очень близких систем, например, натуральных каучуков из различных источников, сополимеров с целью оценки их состава и разветвленности, а также экзотических объектов, типа меда или овсяной каши [14, 15].

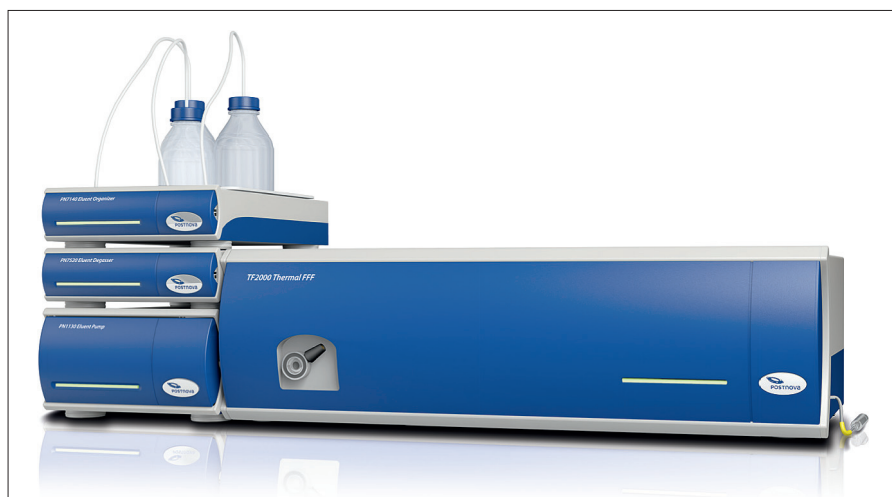


Рис. 8. Система проточного фракционирования в термическом поле TF2000 Thermal FFF (TF3)

Система TF2000 может быть реализована в виде отдельного модуля, дополняющего традиционные приборы для разделения в асимметричных потоках. Кроме того, в Thermal FFF нет ограничения по размеру частиц, поэтому могут быть разделены даже разветвленные и сшитые полимеры сверхвысокой молекулярной массы, а также гели и агрегаты. С другой стороны, из-за высокой температуры одной из стенок канала (до 180 °C) метод накладывает ограничение на температурную устойчивость исследуемых объектов. Примечательно, что только в этом

году впервые опубликованы результаты исследования отечественных ученых, которое посвящено актуальнейшей проблеме сопоставления асфальтовых фракций нефтей различных месторождений с помощью метода проточного фракционирования в поперечном температурном поле [16].

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ МИКРОЧАСТИЦ В ГРАВИТАЦИОННОМ ПОЛЕ С РАЗДЕЛЕНИЕМ ПОТОКОВ (SPLITT)

Гравитационное фракционирование – это единственный на сегодня коммерчески доступный метод препаративного разделения (GF3). Количества пробы, используемые в GF3, могут составлять несколько миллиграмм, грамм или даже больше, тогда как в других методах FFF – от микрограмма до миллиграмма. Кроме того, проба со смесью вводится в канал непрерывно, благодаря чему достигается высокая пропускная способность и разделение на две размерные фракции до 500 г микрочастиц в час.

В гравитационном поле микрочастицы оседают с достаточной скоростью, поэтому при введении ламинарного потока, перпендикулярного направлению оседания, можно добиться разделения частиц. Для этого используется специальный канал, длина которого, в зависимости от задачи, может достигать до метра. Этот канал имеет два входа (для образца и для растворителя) и два выхода (рис. 9). Регулируя скорость потока образца (время оседания или всплытия) и растворителя можно препаративно разделять довольно близкие по размерам и массе частицы, для которых не подходят обычные фильтрационные способы. Метод удобен для очистки взвесей частиц (например, природных) от нежелательных

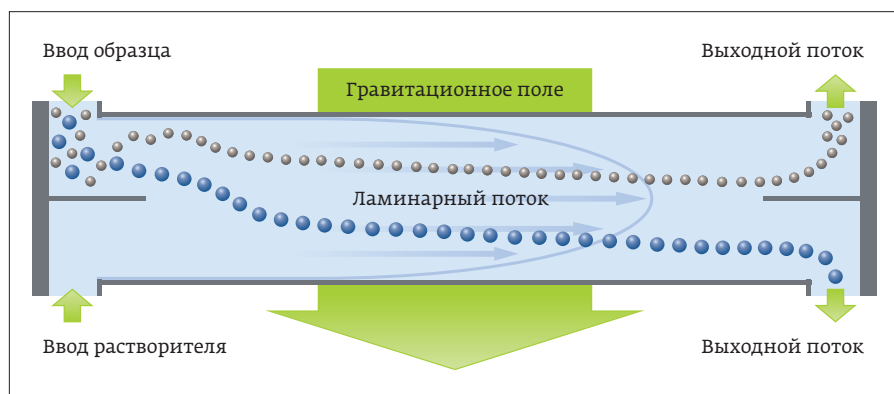


Рис. 9. Схема канала для гравитационного фракционирования частиц

включений. Хотя в большинстве случаев в качестве носителя применяется вода, есть версии каналов для других элюентов. После фильтрации частиц растворитель можно использовать вновь. Система GF2000 Splitt FFF полностью интегрирована и включает детектор PN3000 XPT для определения размера и формы фракций частиц, вылетающих из канала (рис. 10). Диапазон разделения составляет от 1 до 300 мкм в зависимости от природы образца.

ДЕТЕКТОРЫ И МОДУЛИ

Компания Postnova Analytics с начала своей работы поставила задачу производства полностью готовых к использованию систем фракционирования в потоках. Помимо канала и средств контроля температуры, необходимы модули подготовки и подачи растворителей/элюентов, устройства ввода образца и ряд детекторов. Системы подачи растворителей выпускаются в нескольких модификациях, в соответствии с задачей пользователя. Например, возможна безметаллическая конструкция для максимального ограничения попадания посторонних ионов металлов, которые могут вызвать коагуляцию частиц в растворе или внести загрязнение при исследовании экологических объектов. Другой тип устройств ввода — из нержавеющей стали — для работы с большинством органических и коррозионно-активных элюентов, которые необходимы для решения задач, возникающих в промышленности. Многолетняя оптимизация конструкции привела к четко определенному набору модулей, однако, при этом система не потеряла гибкости.

Для определения размеров, формы, концентрации, молекулярной массы, а также состава частиц в отдельных фракциях к платформе подключают ряд детекторов. Часть из них, например, детекторы статического светорассеяния, выпускаются компанией Postnova. В 2012 году был представлен 21-угловой детектор статического светорассеяния PN3621 MALS, обладающий максимальным числом углов и высокой точностью определения молекулярной массы для крупных наночастиц полимеров. При одновременном применении детекторов статического и динамического све-

торассеяния можно охарактеризовать распределение наночастиц по размерам, а также получить информацию об их форме, сопоставляя гидродинамический радиус и радиус инерции. Такие исследования дают ценные сведения о структуре биомолекул и полимеров в растворе, проливают свет на состояние нанотрубок разной длины в ряде растворителей и др. Компания выпускает оптический детектор микрочастиц PN3000 XPT, который может в режиме реального времени определять их концентрацию, форму и размеры. Детекторы других извест-

ных мировых производителей полностью интегрируются в систему и управляются при помощи единого программного обеспечения NovaFFF. Некоторые стандартные задачи, такие как определение разветвленности полимеров, также интегрированы в ПО.

Большинство производителей масс-спектрометров с индуктивно-связанной плазмой ICP-MS выпускает прямые интерфейсы для ввода пробы. Такая конструкция позволяет создавать трехмерные диаграммы зависимости элементного состава (концентрации определенных элементов) от размера и концентрации частиц. Такой метод крайне важен при оценке воздействия тех или иных элементоорганических соединений и неорганических наночастиц на живые организмы, поиске и изучении состояния определенных элементсодержащих белков, при искусственной функционализации наночастиц, а также в исследованиях по



Рис. 10. Система проточного фракционирования частиц в поперечном гравитационном поле GF2000 Splitt FFF (GF3)

накоплению различных элементов в живых организмах или в наночастицах, присутствующих в окружающей среде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Компания Postnova Analytics считает своей основной и главной задачей производство и поставку полностью оптимизированного профессионального оборудования в области фракционирования нано- и микрочастиц в потоке в присутствии внешнего поля. Сегодня уникальная платформа Postnova FFF состоит из систем фракционирования в ассиметричных потоках AF4, в мембранных трубках (Hollow fiber Flow FFF, HF5), в центробежном поле (Centrifugal FFF, CF3), при градиенте температуры между нижней и верхней поверхностью канала, (Thermal FFF, TF3), помимо этого, система допускает использование колонок ГПХ для решения задач ОТК в соответствии с общепринятыми методиками. Системы могут комплектоваться любыми концентрационными детекторами, а также детекторами светорассеяния собственного производства. Все элементы интегрированы или легко подключаются в единое ПО управления, сбора и анализа данных – NovaFFF. Помимо производства приборного парка компания Postnova FFF поддерживает большое число стандартных образцов размера частиц, которые позволяют валидировать и проверять надлежащую работу оборудования, а также совершенствовать используемые модели расчета.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Katasonova O. N., Fedotov P. S.** Methods for continuous flow fractionation of microparticles: Outlooks and fields of application // *Journal of Analytical Chemistry*. 2009. V. 64. № 3. P. 212–225.
2. **Giddings J. C.** The field-flow fractionation family: underlying principles. In: Schimpf M., Caldwell K., Giddings J. C., editors. *Field-flow fractionation handbook*. New York: John Wiley&Sons. 2000. 616 p.
3. **Giddings J. C.** A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities // *Separation Science*. 1966. № 1. P. 123–125. DOI: 10.1080/01496396608049439.
4. **Giddings J. C.** Filed-Flow Fraction: A Versatile Method for the Characterization of Macromolecular and Particulate Materials // *Anal. Chem*. 1981. V. 53. N11. P. 1170A.
5. **Giddings J. C.** Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal and particulate materials // *Science*. 1993. V. 260. P. 1456–1465.
6. **Mes E. P., de Jonge H., Klein T., Welz R. R., Gillespie D. T.** Characterization of high molecular weight polyethylenes using high temperature asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line infrared, light scattering, and viscometry detection // *J Chromatogr A*. 2007 Jun 22; 1154(1–2). P. 319–330.
7. **Jungmann N., Schmidt M., and Maskos M.** Characterization of Polyorganosiloxane Nanoparticles in Aqueous Dispersion by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation // *Macromolecules* 2001 34 (23), 8347–8353. DOI: 10.1021/ma0106752.
8. **Tae Joon Cho, Vincent A. Hackley.** Fractionation and characterization of gold nanoparticles in aqueous solution: asymmetric-flow field flow fractionation with MALS, DLS, and UV-Vis detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010. 398 (5). P. 2003–2018.
9. **Sujeong Han, Jaeyeong Choi, Yeongsuk Yoo, Eui Chang Jung, Seungho Lee.** Size Monitoring in the Synthesis of Silica Nanoparticles Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4). *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2016 37 (10.1002/bkcs.2016.37.issue-3), 335–343.
10. **Otte T., Pasch H., Macko T., Brüll R., Stadler F. J., Kaschta J., Becker F., Buback M.** Characterization of branched ultrahigh molar mass polymers by asymmetrical flow field-flow fractionation and size exclusion chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2011 Jul 8. V. 1218(27). P. 4257–4267. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.072.
11. **Fukuda J., Iwura T., Yanagihara S., Kano K.** Separation and quantification of monoclonal-antibody aggregates by hollow-fiber-flow field-flow fractionation // *Anal Bioanal Chem*. 2014 Oct; V. 406(25). P. 6257–6264. DOI: 10.1007/s00216-014-8065-4.
12. **Fedotov P. S., Ermolin M. S., Katasonova O. N.** Field-flow fractionation of nano- and microparticles in rotating coiled columns // *Journal of Chromatography A*. 2015 V. 1381. P. 202–209. DOI.org/10.1016/j.chroma.2014.12.079
13. **Gabrielson J. P., Brader M. L., Pekar A. H., Mathis K. B., Winter G., Carpenter J. F., Randolph T. W.** Quantitation of aggregate levels in a recombinant humanized monoclonal antibody formulation by size-exclusion chromatography, asymmetrical flow field flow fractionation, and sedimentation velocity // *J Pharm Sci*. 2007 Feb. V. 96(2). P. 268–279.
14. **Williams S. K., Lee D.** Field-flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies // *J Sep Sci*. 2006 Aug. V. 29(12). P. 1720–1732.
15. **Runyon J. R., Williams S. K.** Composition and molecular weight analysis of styrene-acrylic copolymers using thermal field-flow fractionation // *J. Chromatogr. A*. 2011 Sep 23. V. 1218(38). P. 6774–6779. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.07.076.
16. **Новиков Е. А., Сергеев Ю. А., Санжаров В. В., Сафиева Р. З., Винокуров В. А.** Применение методов многомерного анализа для характеристики дегазированных нефтей на основе данных фракционирования наночастиц нативных асфальтенов в поперечном температурном поле // *Нефтехимия*, 2019, 59 (1), с. 39–53.
Novikov E. A., Sergeev Ju. A., Sanzharov V. V., Safieva R. Z., Vinokurov V. A. Application of multivariate analysis methods for characterization of degassed oils based on the data on the fractionation of nanoparticles of native asphaltene in the transverse temperature field // *Petroleum Chemistry*. 2019. V. 59 (1). P. 39–53.