

DIN EN ISO 21362



ICS 07.120

Entwurf

Einsprüche bis 2024-10-30
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN ISO/TS 21362:2021-07

**Nanotechnologien –
Analyse von Nanoobjekten mit Hilfe von
Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung und zentrifugaler
Feldflussfraktionierung (ISO/DIS 21362:2024);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21362:2024**

Nanotechnologies –
Analysis of nano-objects using asymmetrical flow and centrifugal field-flow fractionation
(ISO/DIS 21362:2024);
German and English version prEN ISO 21362:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-08-30 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nmp@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 137 Seiten

DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP)

- a) 7.8 „Verwendung der FFF-Theorie zur Auswahl der Anfangseinstellungen“ eingefügt;
- b) einen Abschnitt zu alternativen Methoden (8.6) eingefügt;
- c) redaktionelle Änderungen vorgenommen.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 80004-1, *Nanotechnologien — Fachwörterverzeichnis — Teil 1: Kernbegriffe*

– Leerseite –

September 2024

prEN ISO 21362

**Nanotechnologien – Analyse von Nanoobjekten mit Hilfe von
Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung und zentrifugaler
Feldflussfraktionierung (ISO/DIS 21362:2024)**

Nanotechnologies – Analysis of nano-objects using asymmetrical flow and centrifugal field-flow fractionation
(ISO/DIS 21362:2024)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	9
4 Symbole und Abkürzungen	17
5 Grundsätze der Betriebsweise	18
5.1 Feldflussfraktionierung (allgemein)	18
5.2 Spezifische Anwendungen nach angelegtem Feld	20
5.2.1 Fluss-Feld	20
5.2.2 Zentrifugalfeld	22
6 Entwicklung von Methoden für die AF4	23
6.1 Allgemeines	23
6.2 Probenfestlegungen	24
6.3 Festlegungen zur mobilen Phase	25
6.4 Fraktionierung	26
6.4.1 Kanal- und Membranauswahl	26
6.4.2 Injektion und Relaxation	28
6.4.3 Optimierung der Flussbedingungen	29
6.4.4 Elutionsprogramm	29
6.4.5 Verwendung der FFF-Theorie zur Auswahl der anfänglichen Flusseinstellungen	30
7 Entwicklung von Verfahren für CF3	31
7.1 Allgemeines	31
7.2 Auswahl der mobilen Phase	31
7.3 Auswahl der Feldstärke	31
7.4 Programm für das Abklingen des Feldes	31
7.5 Auswahl der Kanalflussrate	32
7.6 Berechnung der Relaxationszeit	32
7.7 Berechnung der Verzögerung der Probeninjektion	32
7.8 Verwendung der FFF-Theorie zur Auswahl der anfänglichen Einstellungen	33
8 Analyse von Nanoobjekten	33
8.1 Allgemeines	33
8.2 Online-Größenanalyse	33
8.3 Online-Konzentrationsanalyse	35
8.3.1 Allgemeines	35
8.3.2 Massenbasierte Verfahren	35
8.3.3 Anzahlbasierte Verfahren	36
8.4 Online-Materialidentifizierung oder -zusammensetzung	37
8.5 Offline-Analyse (Fraktionssammlung)	38
8.6 Alternative und aufkommende Verfahren	38
9 Qualifizierung, Leistungskriterien und Messunsicherheit	39
9.1 Systemqualifizierung und Qualitätskontrolle	39
9.1.1 Grundlegende Systemqualifizierung	39
9.1.2 Fokussierleistung	40
9.1.3 Flussrate der Trägerflüssigkeit	41
9.1.4 Trennfeld	41
9.2 Leistungskriterien der Methode	41
9.2.1 Wiederfindung	41
9.2.2 Selektivität	42
9.2.3 Retentionsverhältnis	43

9.2.4	Auflösung	43
9.3	Präzision des Verfahrens und Messunsicherheit	43
10	Allgemeine Vorgehensweisen zur Messung von Proben	44
10.1	Einleitung	44
10.2	Kalibrierung der Retentionszeit für die Online-Größenanalyse	44
10.2.1	Kalibrierung des AF4-Kanals	44
10.2.2	Kalibrierung der AF4-Retentionszeit für Online-Größenmessungen	45
10.3	Allgemeiner Ablauf der Messung in der AF4	46
10.4	Allgemeiner Ablauf der Messung in der CF3	47
11	Prüfbericht	47
11.1	Allgemeines	47
11.2	Prüfeinrichtung und Messparameter	48
11.2.1	Angaben für AF4-Aufzeichnung/Berichterstattung	48
11.2.2	Angaben zur CF3-Aufzeichnung/Berichterstattung	49
11.3	Berichterstattung der Prüfergebnisse	49
Anhang A (informativ) Zusammenfassung eines Ringversuchs		51
A.1	Überblick über den Versuch	51
A.2	Prüfmaterialien	51
A.3	Vorschriften und Messgrößen	53
A.4	Ergebnisse für das Qualitätskontrollmaterial (QCM)	54
A.5	Ergebnisse für die Massenwiederfindung für Prüfmaterial (TM)	55
A.6	Fraktogramme und Peak-Erkennung beim Prüfmaterial (TM)	57
A.7	RMS-Radius und Selektivität	60
A.8	Vergleich von DLS-, SEM- und RMS-Größenmessungen	62
A.9	Restpeaks	64
A.10	Totzeit-Peak und nicht identifizierte Peaks	65
A.11	Retentionsverhältnis	65
A.12	Elutionszeit im Vergleich zur Retentionszeit	66
A.13	Schlussfolgerungen	66
Literaturhinweise		68

Bilder

Bild 1	— Schematische Darstellung der Feldflussfraktionierung	20
Bild 2	— Schaubild der CF3, das das Trennfeld und Größenfraktionierung darstellt	22
Bild 3	— Darstellung einer trapezförmigen Kanalgeometrie. Übernommen von Litzen und Wahlund 1991 [22]	26
Bild 4	— Grafische Darstellung üblicher Elutionsprogramme	30
Bild A.1	— Summenhäufigkeitsverteilungen anzahlgewichteter Partikeldurchmesser, gemessen mit REM	52
Bild A.2	— Beispiel für eine REM-Aufnahme für S100 (60 000-fache Vergrößerung, Spannung 20 kV)	53
Bild A.3	— Überlagerte AF4-Fraktogramme in dreifacher Ausführung, die von Labor 4 für TM berichtet wurden und eine beispielhafte Leistung mit Basislinienauflösung zeigen	58
Bild A.4	— Überlagerte CF3-Fraktogramme in dreifacher Ausführung, die von Labor 16 für TM berichtet wurden und eine beispielhafte Leistung mit Basislinienauflösung zeigen	59
Bild A.5	— Überlagerte AF4-Fraktogramme in dreifacher Ausführung, die von Labor 1 für TM berichtet wurden, als Beispiel für eine mangelhafte Gesamtleistung der Messung	60
Bild A.6	— RMS-Radius in Abhängigkeit von der Peak-Nummer	61
Bild A.7	— Größenselektivität in Abhängigkeit von der Labornummer und der Technik	62
Bild A.8	— Für TM berichtete DLS-Größen im Vergleich zur REM- und RMS-Äquivalentkugel	63
Bild A.9	— Für TM berichtete Kugelmodellgröße im Vergleich zur REM- und RMS-Äquivalentkugel	64

Tabellen

Tabelle A.1 — Im ILC verwendete monomodale Siliciumdioxid-Partikel	51
Tabelle A.2 — Berichtete Mittelwerte für Wiederfindung und RMS-Radius für QCM unter Anwendung von AF4 ^a	54
Tabelle A.3 — Berichtete Mittelwerte für Wiederfindung, RMS-Radius und DLS Durchmesser für QCM unter Anwendung von CF3 ^a	55
Tabelle A.4 — Berichtete Wiederfindung für TM unter Anwendung von AF4 ^a	56
Tabelle A.5 — Berichtete Wiederfindung für TM unter Anwendung von CF3 ^a	56
Tabelle A.6 — Berechnete Retentionsverhältnisse für jeden AF4-Peak	65
Tabelle A.7 — Berechnete Retentionsverhältnisse für jeden CF3-Peak	66

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 21362:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 229 „Nanotechnologies“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 352 „Nanotechnologien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN ISO/TS 21362:2021 ersetzen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 21362:2024 wurde von CEN als prEN ISO 21362:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO keine Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 229, *Nanotechnologies*, gemeinsam mit dem Technischen Komitee IEC/TC 113, *Nanotechnology standardization for electrical and electronic products and systems*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 352, *Nanotechnologies*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet. Der Entwurf wurde den nationalen Mitgliedsorganisationen von ISO und IEC zur Abstimmung vorgelegt.

Diese erste Ausgabe ersetzt ISO/TS 21362:2018, die technisch überarbeitet wurde. Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- ein zusätzlicher Abschnitt, der alternative und aufkommende Verfahren behandelt;
- geringfügige technische Überarbeitungen, um Angaben auf den derzeitigen Stand der Technik zu aktualisieren;
- Anhang A, in dem ein von VAMAS durchgeführter Ringversuch zusammengefasst ist.

Einleitung

Die Fähigkeit, verschiedene Grundgesamtheiten von Nanoobjekten und ihre Agglomerate oder Aggregate zu isolieren und zu analysieren, die oft in komplexen Matrizen suspendiert oder aus diesen extrahiert werden, ist entscheidend für Anwendungen, die von der Materialforschung und Nanofertigung bis hin zur Regulierungsaufsicht und umweltbezogenen Risikobewertung reichen. Darüber hinaus ist die Fähigkeit, diese Analyten mit minimalen Störungen ihres natürlichen oder nativen Zustandes zu charakterisieren, in hohem Maße wünschenswert. Die Liste verfügbarer Techniken, mit denen solche Ziele erreicht werden können, ist relativ kurz, und während alle Techniken Vor- und Nachteile haben und keine einzelne Technik allein für alle möglichen Anwendungen und Materialien angemessen oder geeignet ist, bietet eine Gruppe zugehöriger Trenntechniken, die gemeinsam als Feldflussfraktionierung (FFF, en: field-flow fractionation) bezeichnet wird und von J. Calvin Giddings 1966 [1] konzeptionell vorgeschlagen wurde, viele Vorteile für nanotechnologische Anwendungen. Bei der FFF wird der in einem flüssigen Medium suspendierte Analyt durch Anlegen eines Trennfeldes (z. B. Fluss, zentrifugal, elektrisch, Temperaturgradient, magnetisch) senkrecht zur Flussrichtung des Analyten und die mobile Phase, die durch einen dünnen festgelegten Kanal eluiert, fraktioniert. Die Trennung tritt auf, wenn der Analyt auf das angelegte Feld reagiert, so dass Grundgesamtheiten mit unterschiedlichen Reaktionsempfindlichkeiten Gleichgewichtspositionen (d. h. im Gleichgewicht mit Diffusionskräften) erreichen, die höher oder niedriger in den laminaren Strömungslinien senkrecht zur Kanalströmung liegen, und somit unterschiedlich eluieren.

Unter den FFF-Varianten sind die Asymmetrischer-Fluss-FFF (in der Literatur verschiedentlich abgekürzt als AF4, A4F, AFFFF, AFFFF oder AsFFFF) und die Zentrifugal-FFF (abgekürzt als CF3, auch als Sedimentations-FFF bezeichnet, verbunden mit der Abkürzung SdFFF) im Handel erhältlich und am weitesten im Bereich der Nanotechnologie verbreitet (für die Einfachheit und Zweckmäßigkeit werden in diesem Dokument die Abkürzungen AF4 und CF3 verwendet). AF4 ist die wohl vielseitigste Technik sowohl im Hinblick auf das breite Spektrum an Anwendungen als auch auf die Materialien und Partikelgrößen, auf die sie angewandt wurde. Die symmetrischer Fluss-FFF (ffff), die ursprüngliche „flussbasierte“ Technik, wie sie 1976 erstmals beschrieben wurde [2], wurde durch die 1987 eingeführte AF4-Technik [3] aufgrund mehrerer Vorteile kommerziell ersetzt, darunter eine einfachere Kanalauslegung, die Möglichkeit, die Probe durch eine transparente obere Kanalwand¹ zu visualisieren, und eine reduzierte Analyt-Bandenverbreiterung. Die Theorie und Anwendung der CF3, wie sie derzeit angewendet wird, wurde 1974 von Giddings und Mitarbeitern beschrieben [4], obwohl ein zentrifugalfeldbasiertes FFF-System erstmals 1967 von Berg und Purcell unabhängig entwickelt und geprüft wurde [5]. Andere FFF-Feldvarianten, wie z. B. thermische, elektrische und magnetische, bieten einzigartige Möglichkeiten, sind jedoch im Hinblick auf ihre Anwendung in der Nanotechnologie oder ihrer kommerziellen Verfügbarkeit begrenzt.

War die FFF einst vorwiegend Spezialisten vorbehalten, werden diese Messgeräte heutzutage allgemein und zunehmend in staatlichen, industriellen und akademischen Labors als Teil des Werkzeugkastens für die Nano-Charakterisierung eingesetzt. Zwei Faktoren sind ausschlaggebend für diesen Anstieg bei deren Nutzung in der Nanotechnologie: die Ausgereiftheit handelsüblicher Messgeräte und die Vielseitigkeit hinsichtlich der Kopplung einer Vielzahl von Detektoren an FFF-Systeme. Im letzteren Fall haben jüngste Entwicklungen zur Verwendung hochempfindlicher Elementardetektoren (z. B. Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma oder ICP-MS) geführt, die für viele Materialien eine verbesserte Charakterisierung und Quantifizierung bieten. Darüber hinaus liefern herkömmliche Konzentrations- oder Größenbestimmungsdetektoren wie beispielsweise solche auf Basis der Absorption von ultraviolettem und sichtbarem Licht (UV-Vis, en: ultraviolet and visible light), Fluoreszenz, Mehrwinkel-Lichtstreuung (MALS, en: multi-angle light scattering) und dynamischer Lichtstreuung (DLS, en: dynamic light scattering) Online-Daten eluierender Grundgesamtheiten und ermöglichen theoretisch genauere Aussagen über unfraktionierte polydisperse Systeme als Offline-Messungen. Die gemessene Retentionszeit eines eluierenden Peaks kann, basierend auf theoretischen Beziehungen oder der Kalibrierung mit einem bekannten Größenstandard, auch zur Schätzung der hydrodynamischen Größe mittels AF4 herangezogen werden. CF3 hat die einzigartige Fähigkeit, Spezies gleicher Größe, aber unterschiedlicher Dichte schnell zu trennen.

1 Ein Ausbeulen der transparenten „obere“ Wand, wenn der Kanal unter Druck gesetzt wird, könnte das Kanalvolumen und den Kanalfluss verändern. Dies könnte unter bestimmten Versuchsbedingungen eine Einschränkung darstellen. Massive Stahlkanalblöcke bieten eine Alternative, die zwar starr, aber nicht transparent ist.

E DIN EN ISO 21362:2024-10
prEN ISO 21362:2024 (D)

Obwohl FFF-basierte Techniken die Fähigkeit besitzen, Analyten über einen extrem breiten Größenbereich von etwa 1 nm bis zu einigen zehn Mikrometern zu trennen und zu charakterisieren, befasst sich dieses Dokument hauptsächlich mit Materialien im Nanomaßstab und ihren dazugehörigen Strukturen. Die grundlegenden Prinzipien, der experimentelle Ansatz und die Gerätetechnik, die beschrieben sind, können jedoch umfassender angewendet werden.

Allgemeine Verweisungen und weiterführende Literatur zur Theorie und Praxis der FFF sowie zu AF4- und CF3-Anwendungen in der Nanotechnologie sind in den Literaturhinweisen [6] bis [18] aufgeführt. In Anhang A ist ein Ringversuch von VAMAS zusammengefasst, der durchgeführt wurde, um die Fähigkeit der AF4- und CF3-Techniken zu bewerten, Bestandteile eines komplexen multimodalen Gemischs von Analyten unter Anwendung verschiedener handelsüblicher Messgeräteplattformen und Messgerätekonfigurationen reproduzierbar und mit annehmbarer Wiederfindung und Auflösung in verschiedenen Labors zu trennen und zu charakterisieren.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument identifiziert als Teil eines integrierten Messsystems Parameter und Bedingungen, die zur Entwicklung und Validierung von Methoden für die Anwendung der Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung und zentrifugalen Feldflussfraktionierung zur Analyse von Nanoobjekten und ihren in wässrigen Medien dispergierten Aggregaten und Agglomeraten erforderlich sind. Zusätzlich zur Fraktionierung der Bestandteile kann die Analyse die Größe, Größenverteilung, Konzentration und Materialidentifizierung mit einem oder mehreren geeigneten Detektoren umfassen. Für die Anwendung werden allgemeine Anleitungen und Verfahren bereitgestellt, und es werden Mindestanforderungen an die Berichterstattung festgelegt, die zur Reproduzierung einer Methode und zur Vermittlung kritischer Aspekte erforderlich sind.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 80004-1, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core vocabulary*

ISO/TS 80004-6, *Nanotechnologies — Vocabulary — Part 6: Nano-object characterization*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 80004-1 und ISO/TS 80004-6 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

Nanomaßstab

Nanoskala

Längenbereich von etwa 1 nm bis 100 nm

[QUELLE: ISO 80004-1:2023, 3.1.1]

3.2

Nanoobjekt

einzelnes Stück Material mit einem, zwei oder drei Außenmaß(en) im Nanomaßstab

[QUELLE: ISO 80004-1:2023, 3.1.5]

3.3

Nanopartikel

Nanoobjekt mit allen Außenmaßen im Nanomaßstab

Anmerkung 1 zum Begriff: Wenn sich die Maße wesentlich unterscheiden (üblicherweise um mehr als das Dreifache), werden Begriffe Nanofaser oder Nanoplättchen dem Begriff Nanopartikel vorgezogen.

[QUELLE: ISO 80004-1:2023, 3.3.4]

3.4

Feldflussfraktionierung

FFF

Trenntechnik, bei der an eine flüssige Suspension, die entlang eines schmalen Kanals geführt wird, ein Feld angelegt wird, um die in der Flüssigkeit vorhandenen Partikel abhängig von ihrer unterschiedlichen Mobilität unter Einwirkung der durch das Feld ausgeübten Kraft zu trennen

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei dem Feld kann es sich z. B. um Gravitationskräfte, Zentrifugalkräfte, einen Flüssigkeitsstrom, elektrische oder magnetische Kräfte handeln.

Anmerkung 2 zum Begriff: Durch den Einsatz eines geeigneten Detektors nach oder während der Trennung wird die Bestimmung der mittleren Größe und der Größenverteilung von Nanoobjekt-Grundgesamtheiten ermöglicht.

3.5

Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung

AF4

Trenntechnik, bei der ein Querflussfeld senkrecht an einen Kanalstrom angelegt wird, um eine Trennung auf der Grundlage des Diffusionskoeffizienten oder der Größe des Analyten zu erreichen

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Querfluss entsteht durch eine halbdurchlässige (Akkumulations-)Wand im Kanal, während der Querfluss an einer gegenüberliegenden undurchlässigen (Abreicherungs-)Wand gleich null ist.

Anmerkung 2 zum Begriff: Im Vergleich dazu wird der Querfluss bei der symmetrischen Fluss-Feldflussfraktionierung getrennt vom Kanalfluss erzeugt, dringt durch eine durchlässige Wand (Fritte) und fließt durch eine gegenüberliegende halbdurchlässige Wand ab.

Anmerkung 3 zum Begriff: Nanoobjekte fraktionieren im Allgemeinen durch den „Normal“-Modus, in dem die Diffusion dominiert und die kleinsten Spezies zuerst eluieren. Im Mikrometer-Größenbereich dominiert in der Regel der „steric-hyperlayer“-Modus der Fraktionierung, bei dem die größten Spezies zuerst eluieren. Der Übergang vom Normal- in den „steric-hyperlayer“-Modus kann durch Materialeigenschaften oder Messparameter beeinflusst werden und ist demnach nicht eindeutig definiert; er kann aber explizit für einen vorgegebenen Satz von Versuchsbedingungen festgelegt werden; normalerweise erfolgt ein Übergang über einen Partikelgrößenbereich von etwa 0,5 µm bis 2 µm.

Anmerkung 4 zum Begriff: Durch den Normal- und den „steric-hyperlayer“-Modus ist die Technik in der Lage, Partikel in einem Größenbereich von ungefähr 1 nm bis etwa 50 µm zu trennen.

3.6

zentrifugale Feldflussfraktionierung

CF3

Trenntechnik, bei der ein zentrifugales Feld senkrecht an einen kreisförmigen Kanal angelegt wird, der sich um seine eigene Achse dreht, um eine Trennung von Partikeln von ungefähr 10 nm bis etwa 50 µm zu erreichen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Trennung wird durch eine Kombination aus Größe und effektiver Partikeldichte gesteuert.

Anmerkung 2 zum Begriff: Der anwendbare Größenbereich hängt von der effektiven Partikeldichte ab und ist durch sie begrenzt.

3.7

Kanal

<Feldflussfraktionierung> dünne bandförmige Kammer mit einem parabolischen Flussprofil, das zur Trennung unter dem Einfluss eines senkrecht zum Kanalstrom angelegten Feldes erforderlich ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Kanaldicke kann variieren und wird nominell durch einen Abstandhalterinsatz bestimmt, während feste Kanäle eine vorgegebene Dicke haben und keine Einsätze verwenden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung wird üblicherweise ein trapezförmiger Kanal verwendet, typischerweise mit einer maximalen Breite von etwa 20 mm bis 25 mm und einer Länge von etwa 100 mm bis 300 mm.

Anmerkung 3 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung ist eine Kanalfläche (Abreicherungs- wand) fest (undurchlässig) und die gegenüberliegende Fläche (Akkumulationswand) besteht aus einer semipermeablen Membran auf einer porösen Fritte.

Anmerkung 4 zum Begriff: Bei zentrifugaler Fluss-Feldflussfraktionierung sind sowohl die Innen- als auch die Außen- wände des Kanals fest (nicht porös) und der Kanal ist gekrümmt. Üblicherweise wird ein trapezförmiger Kanal verwendet, typischerweise mit einer Breite von 10 mm bis 20 mm und einer Länge von 300 mm bis 550 mm.

3.8

Abstandhalter

<Feldflussfraktionierung> dünne Kunststoffolie mit einem Ausschnitt, der die Dicke und die seitlichen Maße des Kanals festlegt

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung werden am häufigsten trapezförmige oder rechteckige Ausschnitte verwendet.

Anmerkung 2 zum Begriff: Typische Dicken von Abstandhaltern, die zur Trennung von Nanoobjekten verwendet werden, liegen im Bereich von 190 µm bis 500 µm.

Anmerkung 3 zum Begriff: Bei festen Kanälen wird kein Abstandhalter verwendet; in diesem Fall sind die Kanalform und -dicke vorgegeben.

3.9

Kanaldicke

<Feldflussfraktionierung> Nenndicke, wie durch den Abstandhalter definiert oder wie in einem Kanal mit fester Höhe vorgegeben

3.10

effektive Kanaldicke

<Feldflussfraktionierung> Dicke aufgrund von Kompressibilität oder Quellung der semipermeablen Membran an der Akkumulationswand, deren effektiver Wert vom Nennwert für einen gegebenen Abstandhalter abweichen kann und unter Verwendung eines genau definierten Analyten mit bekanntem Diffusionsvermögen unter den Prüfbedingungen bestimmt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die gemessene effektive Kanaldicke hängt von anderen Faktoren ab, wie z. B. den Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der Membran und der Variabilität bei der Fertigung der Abstandhalter.

3.11

Akkumulationswand

Oberfläche eines Feld-Flussfraktionierungskanals, auf die Probenkomponenten durch das angelegte Feld, das senkrecht zum Kanalstrom wirkt, gezwungen werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung ist die Akkumulationswand flach und besteht aus einer semipermeablen Membran auf einem porösen Frittensubstrat.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei zentrifugaler Feldflussfraktionierung ist die Akkumulationswand undurchlässig und gekrümmt und befindet sich relativ zur Abreicherungs- wand weiter von der Rotationsachse entfernt. In dem seltenen Fall, dass die Partikel eine geringere Dichte als das wässrige Medium haben, sind die Abreicherungs- und Akkumulationswände umgekehrt.

3.12

Abreicherungswand

Oberfläche eines Feld-Flussfraktionierungskanals gegenüber der Akkumulationswand, die aufgrund der Bewegung des Analyten zur Akkumulationswand im angelegten Feld an Analyten abgereichert ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung ist die Abreicherungswand flach und undurchlässig.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei zentrifugaler Feldflussfraktionierung ist die Abreicherungswand undurchlässig und gekrümmt und befindet sich relativ zur Akkumulationswand näher an der Rotationsachse. Wenn die effektive Partikeldichte niedriger als die Dichte des Mediums ist, kehren sich die Abreicherungs- und Akkumulationswände um.

3.13

Trägerflüssigkeit

Elutionsmittel

mobile Phase

flüssige Phase, die zur Trennung und zum Transport von Analyten verwendet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Elutionsmittel oder die mobile Phase können Salze, Tenside und/oder andere chemische Bestandteile enthalten, die für eine optimierte Trennung und Wiederfindung eines Analyten erforderlich sind.

Anmerkung 2 zum Begriff: In diesem Dokument sind nur wässrige Phasen relevant, aber es können auch organische Lösemittel verwendet werden, wenn System und Kanal kompatibel sind.

3.14

Elution

<Feldflussfraktionierung> Verfahren, durch das Analyten in der mobilen Phase oder im Elutionsmittel durch den Fraktionierungskanal transportiert werden und aus diesem austreten

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Elution beginnt nach Abschluss der Injektion, Fokussierung und anderer Schritte vor der Elution.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Elution kann mit und ohne ein angelegtes Feld auftreten.

3.15

Elutionszeit

<Feldflussfraktionierung> abgelaufene Zeit nach Beginn der Elution und unter Ausschluss von vorausgehenden Schritten wie z. B. Injektion, Fokussierung oder anderen Übergängen

Anmerkung 1 zum Begriff: Elution und Retention teilen sich dieselbe Zeitachse und können austauschbar verwendet werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die horizontale (Zeit-)Achse eines Fraktogramms wird im Allgemeinen als Elutionszeit angegeben.

3.16

Fokussierung

<Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung> Verfahren, bei dem während und nach der Probeninjektion ein ausgeglichener, von entgegengesetzten Enden des Kanals (Einlass und Auslass) eintretender Fluss angewendet wird, um die Probenkomponenten in einem dünnen Band nahe des Einlassanschlusses und nahe der Akkumulationswand zu fokussieren

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser Schritt ist notwendig, um die Bandenverbreiterung zu minimieren und es den Komponenten zu ermöglichen, eine Gleichgewichtslage (Relaxation) innerhalb des Kanals zu erreichen.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Fokussierung wird bei der Fritteneinlassinjektion nicht verwendet.

3.17

Relaxation

<Feldflussfraktionierung> Verfahren, bei dem die Probenkomponenten ihren Gleichgewichtszustand in Bezug auf die entgegengesetzten Kräfte der Diffusion und das angelegte Feld annehmen, bevor die Elution eingeleitet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei der Fluss-Feldflussfraktionierung gibt es zwei Möglichkeiten, eine Relaxation zu erreichen: normale Fokussierungsrelaxation und Fritteneinlass- (en: Frit inlet) oder hydrodynamische Relaxation.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei zentrifugaler Feldflussfraktionierung wird der Kanalfluss gestoppt (en: Stop-Flow), um Relaxation zu erreichen.

3.18

Injektionsfluss

<Feldflussfraktionierung> Fluss, der die Probe aus der Injektionsschleife und in den Fraktionierungskanal transportiert

Anmerkung 1 zum Begriff: Je nach Auslegung des Messgeräts kann die Injektion über einen separaten Injektionsanschluss oder durch den Kanaleinlassanschluss erfolgen.

3.19

Querfluss

<Fluss-Feldflussfraktionierung> Flussfeld, das senkrecht zum Kanalfluss angelegt wird, um eine Trennung der Analyten zu erreichen

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung wird ein Querfluss durch die Druckdifferenz über eine permeable Membran an der Akkumulationswand erzeugt, was zu einer nach unten gerichteten Kraft führt, die mit zunehmendem Abstand von der Akkumulationswand abnimmt.

Anmerkung 2 zum Begriff: Der Querfluss wird mit einer Durchflusssteuerung in Kombination mit einer einzelnen Pumpe oder mit einer zweiten zugeordneten Pumpe erzeugt.

3.20

Kanal-Einlassfluss

<Feldflussfraktionierung> mobile Phase oder Elutionsmittel, die/das am vorderen Ende in den Kanal eintritt (stromaufwärts)

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung wird der Einlassfluss während der Elution zwischen Querfluss und Kanalfluss aufgeteilt.

3.21

Kanalfluss

<Feldflussfraktionierung> parabolische laminare Strömung durch den Kanal und parallel zur Akkumulationswand

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Kanalfluss entspricht im Allgemeinen dem Fluss, der unter typischen Versuchsbedingungen aus dem Kanal austritt und in die Detektoren eintritt, kann sich jedoch unterscheiden, wenn der aus dem Kanal austretende Fluss geteilt wird.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung führt der Flüssigkeitsverlust durch die permeable Akkumulationswand zu einer linear abnehmenden Kanalflussgeschwindigkeit. Dieser Gradient kann durch eine trapezförmige Auslegung des Kanals mit abnehmender Kanalbreite zum Auslass hin ausgeglichen werden.

3.22

Tot-Volumen

<Feldflussfraktionierung> Flüssigkeitsvolumen, festgelegt durch die Maße des Kanals plus das Volumen zwischen dem Kanalausgang und dem ersten Detektor

3.23

Totzeit-Peak

<Feldflussfraktionierung> im Fraktogramm auftretender Peak, der nicht zurückgehaltenem Material entspricht, das sich nicht im Gleichgewicht mit dem Trennfeld befinden

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Totzeit-Peak bewegt sich mit der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Trägerflüssigkeit und eluiert vor zurückgehaltenen Komponenten.

Anmerkung 2 zum Begriff: Nicht zurückgehalten bezeichnet in diesem Zusammenhang Komponenten, die nicht durch das Feld getrennt werden und mit dem Totzeit-Peak eluieren. Nicht zurückgehalten hat bei herkömmlichen chromatographischen Trennungen auf Enthalpiebasis eine andere Bedeutung.

Anmerkung 3 zum Begriff: Ein Totzeit-Peak entsteht durch die mechanische Unterbrechung oder Änderung der Flussbedingungen, wenn die Elution eingeleitet wird; in diesem Zusammenhang sollte der Totzeit-Peak idealerweise nur die mobile Phase und kleine molekulare Spezies enthalten, die von dem angelegten Feld unbeeinflusst sind.

3.24

Totzeit

Zeit zwischen dem Beginn der Elution und der Erfassung des Totzeit-Peaks, festgelegt bei seiner maximalen Signalintensität

3.25

Retentionszeit

Zeit zwischen dem Beginn der Elution und der Erfassung eines Analytenpeaks, festgelegt bei seiner maximalen Signalintensität

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei einem Gaußschen Peak sind das Maximum und Peakmitte äquivalent.

Anmerkung 2 zum Begriff: Retentionszeit und Elutionszeit verkörpern gleichwertige Zeitachsen. Letzteres ist ein allgemeiner Begriff, während ersterer üblicherweise im Zusammenhang mit einem Analytenpeak verwendet wird.

Anmerkung 3 zum Begriff: Die Netto-Retentionszeit kann durch Subtraktion der Totzeit von der gemessenen Retentionszeit des Peaks ermittelt werden. Dies entspricht einer Normalisierung der Retentionszeit auf die Elution von nicht zurückgehaltenem Material, das sich mit der mittleren Geschwindigkeit der parabolischen Strömung im Kanal bewegt.

3.26

Retentionsparameter

<Feldflussfraktionierung> dimensionsloser Parameter, gleich dem Verhältnis des Schwerpunktsabstands der Analytenzone (von der Akkumulationswand) zur Kanaldicke

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen dem angelegten Feld und dem Analyten.

3.27

Retentionsverhältnis

<Feldflussfraktionierung> Verhältnis der mittleren Geschwindigkeit der Analytenzone zur mittleren Geschwindigkeit der mobilen Phase im Kanal während der Elution

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieses kann theoretisch berechnet oder empirisch aus dem Verhältnis der Elutionszeiten der Totzeit- und Analytenpeaks bestimmt werden und steht in direktem Zusammenhang mit dem Retentionsparameter.

3.28

Selektivität

<Feldflussfraktionierung> Maß für die Fähigkeit einer Methode, Analyten mit unterschiedlichem Diffusionskoeffizienten oder unterschiedlicher Größe zu trennen

Anmerkung 1 zum Begriff: Empirisch wird die Selektivität aus der Steigung einer doppelt logarithmischen Auftragung des Diffusionskoeffizienten gegen das Retentionsverhältnis oder der Retentionszeit gegen den Durchmesser des Analyten berechnet.

Anmerkung 2 zum Begriff: Eine hohe Selektivität spiegelt eine große Änderung der Retentionszeit bei einer geringen Variation der Analytengröße wider.

Anmerkung 3 zum Begriff: Bei der zentrifugalen Feldflussfraktionierung hängt die Selektivität auch von der effektiven Masse ab, allerdings wird die empirische Beziehung in der gleichen Weise wie bei Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung definiert.

3.29

Auflösungsfaktor

Fraktionierungsvermögen

Verhältnis der Differenz der Retentionszeit zum Durchschnitt der Peakbreiten, gemessen als Halbwertsbreite für zwei benachbarte eluierende Analyten

Anmerkung 1 zum Begriff: Maß für den Grad der Trennung zwischen benachbarten oder überlappenden Peaks.

3.30

Bandenverbreiterung

Gesamtdispersion oder Erweiterung eines Analytenbandes, wenn der Analyt ein Trennsystem durchläuft

3.31

Zonenverbreiterung

<Feldflussfraktionierung> Verbreiterung der Breite der Probenzone während der Trennung im Kanal

3.32

Normalmodus (der Elution)

Brownscher Modus

<Feldflussfraktionierung> Elutionsmodus, bei dem die Diffusion die dominierende entgegengesetzte Kraft zur aufgebrachten orthogonalen Kraft ist (z. B. Querfluss oder Zentrifugalkraft), was zu einer Elutionsfolge führt, bei der kleinere Partikel vor größeren Partikeln eluieren

Anmerkung 1 zum Begriff: Alle Nanopartikel unterliegen einer Elution im Normal- oder Brownschen Modus, der bei Partikeldurchmessern kleiner als etwa 0,5 µm dominiert; Nanoobjekte mit mindestens einem Maß größer als 0,5 µm können im „steric-hyperlayer“-Modus eluiert werden. Die obere Grenze für die Elution im Normalmodus ist nicht eindeutig festgelegt und hängt sowohl vom Material als auch von den Messfaktoren ab.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei der zentrifugalen Feldflussfraktionierung wird bei der angegebenen Elutionsfolge davon ausgegangen, dass alle Partikel die gleiche Dichte aufweisen; bei Partikeln, die sich sowohl in der Größe als auch in der Dichte unterscheiden, kann die Elutionsfolge umgekehrt werden.

3.33

steric-lift-hyperlayer-Modus (der Elution)

<Feldflussfraktionierung> Elution, bei der die Diffusionskräfte vernachlässigbar sind und die Bewegung der Partikel aufgrund der aufgebrachten orthogonalen Kraft (z. B. Querfluss oder Zentrifugalkraft) im Wesentlichen durch den Widerstand der Akkumulationswand selbst beeinträchtigt wird, was zu einer Elutionsfolge führt, die im Vergleich zum Normalmodus umgekehrt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Sterische Effekte treten auf, wenn größere Partikel an der Akkumulationswand Schichten bilden, die im Durchschnitt höher in das parabolische Flussprofil des Kanals hineinragen. Als Ergebnis werden größere

E DIN EN ISO 21362:2024-10
prEN ISO 21362:2024 (D)

Partikel schneller als kleinere Partikel migrieren. „Hyperlayer“ oder „lift-hyperlayer“ treten auf, wenn die Partikel aufgrund hydrodynamischer Effekte dünne Schichten oberhalb (verlängert von) der Akkumulationswand bilden, wobei größere Partikel erhöhter sind als kleinere Partikel, was zu ihrer schnelleren Migration führt. Da „steric-“ und „lift-hyperlayer“ in enger Beziehung stehen, ein Kontinuum bilden und ein ähnliches Elutionsverhalten erzeugen, werden sie häufig zusammengeführt.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die untere Grenze für die Elution im „steric-hyperlayer“-Modus ist nicht eindeutig festgelegt und kann sowohl vom Material als auch von Messfaktoren wie der Kanaldicke und Flussrate oder der angelegten Feldstärke abhängen. Im Allgemeinen unterliegen Partikel mit einem effektiven Durchmesser von mehr als etwa 1 µm einer „steric-hyperlayer“-Elution, allerdings können „steric-hyperlayer“-Effekte in einem Bereich von etwa 0,5 µm bis etwa 2 µm auftreten. Der Umkehrpunkt kann experimentell für einen bestimmten Satz von Bedingungen mit einem geeigneten Detektionsverfahren, wie z. B. MALS, bestimmt werden.

3.34

Fraktogramm

<Feldflussfraktionierung> zweidimensionale grafische Darstellung von Daten, die aus einem Experiment abgeleitet wurden, üblicherweise mit einem oder mehreren Detektorsignalen auf der Ordinate und Retentionszeit auf der Abszisse

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies ist analog zu einem Chromatogramm in der herkömmlichen Chromatographie.

3.35

Wiederfindung

<Feldflussfraktionierung> Verhältnis der eluierten Analytmenge zu der in den Fraktionierungskanal eintretenden Analytmenge, ausgedrückt in Prozent

Anmerkung 1 zum Begriff: Mit einem massensensitiven Detektor experimentell bestimmt, entweder Offline (direkt in der Probe vor der Injektion und nach der Sammlung des eluierenden Peaks gemessen) oder Online (durch Vergleich der Peakflächen, die mit und ohne Anwendung des angelegten Feldes und der Fokussierung erhalten wurden).

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Wiederfindung kann auf der Grundlage des Signals von nicht masseempfindlichen Detektoren, wie z. B. Lichtstreuung, geschätzt werden, das dem Einfluss von Änderungen der Detektorantwort aufgrund von Änderungen der Größenverteilung oder anderer Versuchsbedingungen unterliegt.

3.36

Rest

<Feldflussfraktionierung> bezieht sich auf ein Material oder einen Peak, das/der aus dem Fraktionierungskanal eluiert, nachdem das angelegte Feld entfernt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Restpeaks enthalten unfraktioniertes Material, das aufgrund seiner physikalisch-chemischen Wechselwirkung mit der Akkumulationswand während der Anwendung des Feldes (z. B. Querfluss oder Zentrifugalkraft) zurückgehalten und freigesetzt wird, sobald dieses Feld auf null abklingt oder auf andere Weise entfernt wird. Häufig enthält dieser Peak Agglomerate oder andere verhältnismäßig große Objekte, deren Diffusionsbewegung nicht ausreicht, um dem angelegten Feld entgegenzuwirken. Der konkrete Ursprung des Restmaterials ist nicht genau definiert und könnte mehrere Faktoren umfassen, die mit der Art des Analyten, den Wechselwirkungen mit der Akkumulationswand oder der Versuchsanordnung (z. B. Flussraten und angelegte Feldstärke) zusammenhängen.

3.37

eingeschaltetes Feld

<Feldflussfraktionierung> bezieht sich auf einen Zustand, in dem das angelegte Feld während eines Elutionsprogramms aktiv ist

3.38

ausgeschaltetes Feld

<Feldflussfraktionierung> bezieht sich auf einen Zustand, in dem das angelegte Feld während eines Elutionsprogramms inaktiv ist

4 Symbole und Abkürzungen

CTA	Cellulosetriacetat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid, $(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$
DAD	Diodenarraydetektor (en: diode array detector)
DLS	dynamische Lichtstreuung (en: dynamic light scattering)
EAF4	elektrische asymmetrische Fluss-Feldflussfraktionierung
F4	Fluss-Feldflussfraktionierung
FWHM	Halbwertsbreite (en: full width at half maximum)
HF5	Hohlfaser-Fluss-Feldflussfraktionierung (en: hollow fibre flow field-flow fractionation)
HPLC	Hochleistungsflüssig(keits)chromatographie (en: high performance liquid chromatography)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (en: inductively coupled plasma mass spectrometry)
ICP-OES	optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (en: inductively coupled plasma optical emission spectroscopy)
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff (en: total organic carbon)
MALS	Mehrwinkel-Lichtstreuung (en: multi-angle light scattering)
MWCO	Molekulargewichtgrenzwert (en: molecular weight cut-off)
NOAA	Nanoobjekte und deren Agglomerate und Aggregate (en: nano-objects and their aggregates and agglomerates)
NIR	Nahinfrarot (en: near infrared)
PES	Polyethersulfon
PSL	Polystyrol-Latex
PTA	Partikel-Tracking-Analyse (en: particle tracking analysis)
RC	regenerierte Cellulose
RM	Raman-Mikrospektroskopie
RSD	relative Standardabweichung (en: relative standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat, $CH_3(CH_2)_{11}SO_4Na$
SPP	Natrium-Pyrophosphat
SEC	Größenausschlusschromatographie (en: size exclusion chromatography)
sp	Einzelpartikel (wie bei der Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma) (en: single particle)
SPR	Oberflächenplasmon-Resonanz (en: surface plasmon resonance)
UV-Vis	ultraviolett und sichtbar (Wellenlängenbereich)(en: ultraviolet-visible)
VAMAS	Versailles Project on Advanced Materials and Standards
λ	Retentionsparameter
R	Retentionsverhältnis
t_0	Totzeit
t_R	Retentionszeit (des Analytenpeaks)
Δt_R	Retentionszeitdifferenz für zwei eluierende Peaks, Mitte-zu-Mitte
t_D	Injektionsverzögerungszeit
w_{avg}	durchschnittliche Breite zweier benachbarter eluierender Peaks, typischerweise definiert als die Halbwertsbreite
w	Kanaldicke (nominal, wie durch einen Abstandshalter in AF4 festgelegt)
w_{eff}	effektive Kanaldicke (wie empirisch in AF4 bestimmt)

l	Schwerpunkt Abstand von der Akkumulationswand
D	translatorischer Diffusionskoeffizient
$\dot{V}_c$	volumetrische Querflussrate in AF4
$\dot{V}_{in}$	volumetrische Kanal-Einlassflussrate
$\dot{V}$	volumetrische Kanal-Auslassflussrate
$\dot{V}_i$	volumetrische Injektionsflussrate
v	Migrationsgeschwindigkeit der Analytenzone im Kanal
$\langle v \rangle$	mittlere längsgerichtete Geschwindigkeit des Trägers (der mobilen Phase) im Kanal
V_0	Tot-Volumen
V_i	Volumen zwischen dem Injektionsventil und dem Kanalinjektionsanschluss
V_l	Volumen der Probeninjektionsschleife
S	Selektivität
R_s	Auflösungsfaktor
$R\%$	Wiederfindung
A_S	Peakfläche der eluierten Probe
A_D	Peakfläche der Probe, die direkt in den Detektor injiziert oder ohne Querfluss eluiert wird
t_1	Zeit, über die $\dot{V}_c$ oder das Zentrifugalfeld während eines Elutionsprogramms konstant gehalten wird
r_g	Trägheitsradius (massengemittelter quadratischer Mittelwert des Radius)
d_H	hydrodynamischer Durchmesser (kugeläquivalent)
d_V	volumenbasierter äquivalenter sphärischer Durchmesser
RPS	Rotationsgeschwindigkeit in Umdrehungen je Sekunde
RPS_0	Rotationsgeschwindigkeit in Umdrehungen je Sekunde zu Beginn der Abklingzeit
G	Zentripetalbeschleunigung (auch als Zentrifugalfeldstärke bezeichnet)

5 Grundsätze der Betriebsweise

5.1 Feldflussfraktionierung (allgemein)

Die Feldflussfraktionierung ist ein flussbasiertes Trennverfahren. Der typische FFF-Betrieb setzt die Freisetzung eines schmalen Probenbandes in eine fließende mobile Phase voraus, die in einem dünnen, gut festgelegten Kanal enthalten ist. Im Vergleich dazu verwendet die herkömmliche Flüssigkeitschromatographie eine gepackte Säule mit einer festen stationären Phase, die mit dem Analyten interagiert, um eine Trennung zu erreichen. Bei der FFF fließen die mobile Phase und der Analyt in Längsrichtung durch den Kanal. Der Kanal ist so ausgelegt, dass die Probenkomponenten entlang seiner Länge getrennt werden, was zur Elution der Bestandteile zu unterschiedlichen Zeiten führt. Der Kanal und sein großes Längenverhältnis sind so ausgelegt, dass er unter normalen Betriebsbedingungen eine parabolische oder nahezu parabolische laminare Strömung zwischen zwei unendlichen Ebenen begünstigt. Obwohl üblicherweise ignoriert, kann der Reibungswiderstand an den Rändern des Kanals durch einen Korrekturfaktor [19] berücksichtigt werden. Bei parabolischem Fluss nähert sich die längsgerichtete Flussgeschwindigkeit an den Kanalwänden aufgrund des Reibungswiderstands null an und nimmt mit dem Abstand von den Wänden zu. Die maximale Geschwindigkeit tritt in der Kanalmitte auf.

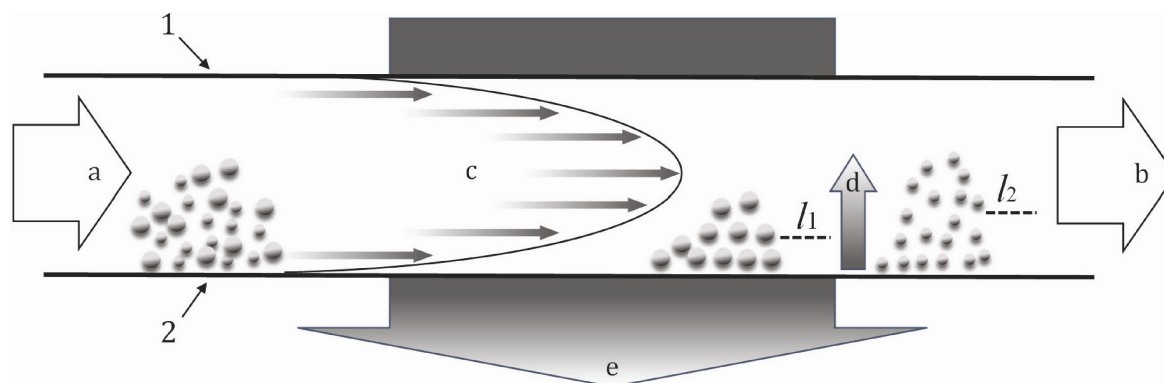
Um eine Trennung zwischen verschiedenen Bestandteilen einer Probe herbeizuführen, wird ein Feld in einer Richtung senkrecht zur Flussachse angelegt (siehe Bild 1). Die Kraft des angelegten Feldes bewegt die Bestandteile in Richtung der Akkumulationswand (unten in Bild 1 dargestellt) und dem entgegen gerichtet ist die Diffusionskraft der betroffenen Spezies. Bestandteile, die sich in Größe (AF4) oder effektiver Masse

(Funktion von Größe und Dichte, CF3) unterscheiden, werden an verschiedenen Positionen innerhalb des parabolischen Flussprofils des Kanals lokalisiert, wodurch jede Grundgesamtheit stromabwärts mit einer Geschwindigkeit verdrängt wird, die dem mittleren parabolischen Fluss an dieser Position entspricht (wobei sich Position auf den Abstand von der Akkumulationswand, l , im rechten Winkel zur Richtung des Kanalfusses bezieht und ein Mittelwert für die Analytenzone oder „Wolke“ ist). Kleinere Bestandteile eluieren vor größeren; dies wird als Normalmodus oder Brownsche Elution bezeichnet und gilt für die meisten Nanoobjekte. Die Fraktionierung größerer Spezies (Mikrometergröße) erfolgt durch „steric-hyperlayer“-Interaktionen („steric-hyperlayer“-Modus, häufig einfach als sterischer Modus bezeichnet), bei denen kleinere Spezies nach größeren eluieren (d. h. umgekehrte Elutionsreihenfolge im Vergleich zum Normalmodus). Der „steric-hyperlayer“-Modus kann beispielsweise dann von Bedeutung sein, wenn Proben große Agglomerate von Nanoobjekten enthalten oder die Bestandteile hochgradig polydispers sind. Der Übergang vom Normal- zum „steric-hyperlayer“-Modus ist nicht genau definiert und kann durch andere Faktoren als die Größe (z. B. Querflussrate) beeinflusst werden [20]; für eine gegebene Probe und eine Reihe von Versuchsbedingungen kann der Übergangsbereich empirisch bestimmt werden.²

Die Fraktionierung wird während des Durchgangs durch den Kanal basierend auf dem Geschwindigkeitsflussprofil erreicht, wonach die mobile Phase, die die getrennten Bestandteile enthält, zu Online-Detektoren und/oder einem Fraktionssammler zur Offline-Analyse austritt. Übliche Detektoren für die Analyse von Nanoobjekten und ihren Aggregaten oder Agglomeraten (NOAA) umfassen die UV-Vis-Absorption, Fluoreszenz, MALS, DLS und Elementdetektoren wie z. B. ICP-MS. Andere Detektoren werden häufiger für polymere oder makromolekulare Analyten (z. B. Viskosimeter, Differentialrefraktometer) oder seltener für NOAAs verwendet (siehe Abschnitt 8 für weitere Einzelheiten).

Bandenverbreiterung resultiert aus der Verbreiterung der Analytenzone während der Probenmigration im FFF-Kanal und aus der experimentellen Bandenverbreiterung (die auch als sekundäre Bandenverbreiterung bezeichnet wird). Die Zonenverbreiterung wird durch die FFF-Theorie beschrieben und ist eine Funktion der Kanalhöhe, des Diffusionskoeffizienten, des Retentionsparameters und des Kanalfusses [21] [22]. Die Zonenverbreiterung kann für einen gegebenen Diffusionskoeffizienten und bekannte Flussraten berechnet werden. Die sekundäre Bandenverbreiterung ist auf Totvolumen- und Mischeffekte im Flüssigkeitspfad der Analytenzone zurückzuführen, die den FFF-Kanal verlässt und durch die Detektorkette führt. Die sekundäre Bandenverbreiterung kann nur experimentell bestimmt werden, und es sollte darauf geachtet werden, sie zu minimieren, indem das Volumen im Flüssigkeitspfad stromabwärts des Trennkanals und zwischen Detektoren minimiert wird.

2 Obwohl theoretisch sowohl der Normal- als auch der sterische Modus gleichzeitig vorhanden sein können, ist dies in der Praxis experimentell nicht durchführbar, da die Fraktionierungsparameter für Nano- oder Mikropartikel optimiert werden würden – nicht für beide. In diesem Zusammenhang würden bei einer Optimierung für Nanoobjekt-Analyten die Partikel im Mikrometerbereich stark zurückgehalten werden, bis das angelegte Feld entfernt oder ausreichend verringert wird. Die Bedingungen wären in diesem Fall nicht für eine sterische Trennung geeignet. Das nach Entfernen des Feldes eluierte Restmaterial könnte gesammelt und mit geeigneteren Fraktionierungsparametern erneut analysiert werden.



Legende

- 1 Abreicherungswand
- 2 Akkumulationswand
- a Zufluss
- b Abfluss
- c parabolisches Flussprofil
- d Diffusion
- e angelegtes Feld

ANMERKUNG Der Schwerpunktabstand (l_1 , l_2) für jede Grundgesamtheit ist für die Elution im Normalmodus dargestellt.

Bild 1 — Schematische Darstellung der Feldflussfraktionierung

5.2 Spezifische Anwendungen nach angelegtem Feld

5.2.1 Fluss-Feld

Fluss-Feldflussfraktionierung (F4) ist eine Elutionstechnik, bei der die Bestandteile durch Flusskontrolle in einem flüssigen Medium getrennt werden. In F4 wird die Trennkraft durch ein senkrecht zur parabolischen Kanalströmung wirkendes Querflussfeld erzeugt. Der Querfluss in F4 wird von einer zweiten Pumpe oder einem Flussregler erzeugt. Bei symmetrischer F4 tritt der Querfluss über eine poröse Fritte an der Abreicherungswand in den Kanal ein und tritt über eine semipermeable Membran auf einer porösen Fritte an der gegenüberliegenden Akkumulationswand aus dem Kanal aus. Die Membranpermeabilität wird so gewählt, dass sie die mobile Phase austreten lässt, während sie den Analyten zurückhält. Die Probenfraktionen eluieren aus dem Kanal und gelangen über den Hauptkanalfluss in die Detektoren. In F4 kann die Retentionszeit t_R von Bestandteilen durch eine modifizierte Version der Giddings-Gleichung vorhergesagt werden [23]:

$$t_R = \frac{\pi \eta d_H w^2}{2kT} \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}} \quad (1)$$

Dabei ist

kT die thermische Energie (Boltzmann-Konstante $\times$ absolute Temperatur);

η die dynamische (oder absolute) Viskosität der Trägerflüssigkeit;

d_H der kugeläquivalente hydrodynamische Durchmesser;

w die Kanaldicke;

$\dot{V}$ die volumetrische Flussrate durch den Kanal (parabolische Strömung);

$\dot{V}_c$ die volumetrische Querflussrate.

Wenn die Querfluss- und Kanalflussraten im F4-System konstant gehalten werden, ist demzufolge die Retentionszeit proportional zum kugeläquivalenten hydrodynamischen Durchmesser der getrennten Bestandteile oder umgekehrt proportional zu ihrem Diffusionskoeffizienten D über die Stokes-Einstein-Beziehung ($D = kT/3\pi\eta d_H$).

Während der Schwerpunkt Abstand der Analytenzone von der Akkumulationswand l die Rate bestimmt, mit der die Grundgesamtheit der Bestandteile im parabolischen Flussprofil eluiert, kann er in einer dimensionslosen Form als Retentionsparameter, $\lambda = l/w$, ausgedrückt werden, ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen dem angelegten Feld und dem Analyten. Für die Fluss-FFF kann der Retentionsparameter wie in Gleichung (2) ausgedrückt werden:

$$\lambda = \frac{V_0 D}{\dot{V}_c w^2} \quad (2)$$

Dabei ist $V_0 = t_0 \dot{V}$ das Tot-Volumen und t_0 die Totzeit in Verbindung mit dem Totzeit-Peak, der nicht zurückgehaltene Bestandteile umfasst und vor allen zurückgehaltenen oder fraktionierten Spezies eluiert. Der Retentionsparameter bezieht sich auf einen empirisch bestimmten Schlüsselwert, der als Retentionsverhältnis, $R = t_0/t_R$, bekannt ist. R wird explizit in Gleichung (3) definiert:

$$R = \frac{v}{\langle v \rangle} \quad (3)$$

Dabei ist

v die Migrationsgeschwindigkeit der Analytenzone durch den Kanal;

$\langle v \rangle$ die durchschnittliche Kanal(längs)geschwindigkeit der mobilen Phase.

Für $R \ll 1$ gilt der folgende Ausdruck:

$$R = 6\lambda \quad (4)$$

Gleichung (4) ist auf 5 % genau, wenn $\lambda < 0,02$ [11]. Wenn R im Bereich von 0,03 bis 0,17 liegt, kann zusätzlich eine Näherung für λ in Gleichung (2) angewendet werden, um die Partikelform zu berücksichtigen [24]:

$$D = \frac{\dot{V}_c w^2}{A V_0} R \quad (5)$$

dabei entspricht die Konstante A für Kugeln, dünne Stäbe bzw. dünne Scheiben einem Wert von 6, 12 bzw. 18.

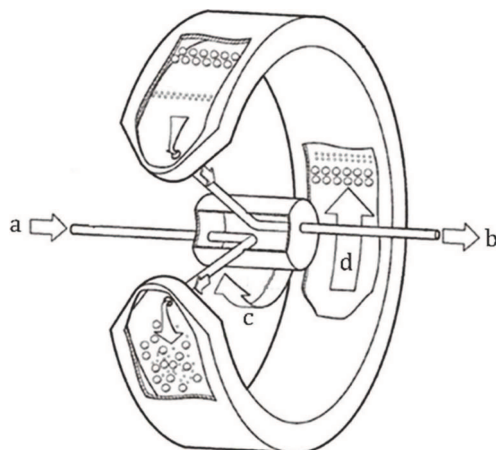
Die Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) hat den symmetrischen Fluss in handelsüblichen Messgeräten ersetzt. Bei AF4 wird der Querfluss durch eine zweite Pumpe oder einen Flussregler erzeugt, durch den Flüssigkeit aufgrund eines Druckunterschieds über die Membranoberfläche durch die semipermeable Membran an der Akkumulationswand geleitet wird; in diesem Fall ist die gegenüberliegende Abreicherungs wand fest und undurchlässig. Unter Berücksichtigung dieser Asymmetrie wird die Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten des Analyten, der Retentionszeit, den Flussbedingungen und der Kanal dicke bei der Elution im Normalmodus unter konstantem Querfluss beschrieben durch [3]:

$$t_R = \frac{w^2}{6D} \ln \left(1 + \frac{\dot{V}_c}{\dot{V}} \right) \quad (6)$$

In diesem Fall ist $t_R = C \times d_H$, wobei C eine Konstante für die verwendeten experimentellen Bedingungen und die Art des vorhandenen Analyten ist. Durch die Kalibrierung der Retentionszeit mit sphärischen Partikeln bekannter Größe (oder bekanntem Diffusionskoeffizienten) kann die hydrodynamische Größe direkt aus der gemessenen Retentionszeit für die unbekannte Probe abgeschätzt werden. Die Beziehung in Gleichung (6) gilt für den durch die Kalibrierung definierten linearen Bereich. Die Genauigkeit der Schätzung hängt auch davon ab, wie genau die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Kalibriermittels mit denen des Analyten übereinstimmen.

5.2.2 Zentrifugalfeld

Bei der zentrifugalen Feldflussfraktionierung (CF3) wird die Trennkraft durch ein senkrecht zum Hauptkanalfluss angelegtes Zentrifugalfeld erzeugt (siehe Bild 2). Das Zentrifugalfeld wird durch die Drehung eines kreisförmigen Kanals generiert, wodurch eine Zentrifugalkraft über den Kanal und senkrecht zum axialen Kanalfluss erzeugt wird. Diese Kraft bewirkt, dass die Bestandteile in Richtung der Akkumulationswand wandern (typischerweise zur Außenwand, es sei denn, die Partikeldichte ist niedriger als die des Mediums).



Legende

- a Probenzufluss
- b Probenabfluss
- c Drehrichtung
- d Kanalfluss

Bild 2 — Schaubild der CF3, das das Trennfeld und Größenfraktionierung darstellt

Bei der CF3-Trennung nimmt das Zentrifugalfeld mit der effektiven Masse zu, die von der Masse des Partikels, der Dichte des Partikels und der Dichte des Fluids abhängt. Als Ergebnis werden größere und dichtere Bestandteile im Verhältnis zu kleineren, weniger dichten Spezies stärker zurückgehalten und eluieren daher langsamer aus dem Kanal. Dies bedeutet für Bestandteile mit einer gleichmäßigen Dichte, dass die Trennung in der CF3 auf der Grundlage der Größe der Spezies erfolgt; Komponenten mit kleinerer Größe eluieren vor größeren Bestandteilen. Theoretisch kann sich die Retentionszeit für Nanoobjekte in der CF3 nach der folgenden Gleichung [4] vorhergesagt werden:

$$t_R = \frac{\pi \Delta \rho w G d_v^3 V_0}{36 k T \dot{V}} \quad (7)$$

Dabei ist

$\Delta \rho$ die Dichtedifferenz zwischen Analyt und Elutionsmittel;

d_v der volumenbasierte äquivalente sphärische Durchmesser;

$\dot{V}$ die volumetrische Kanalflussrate;

V_0 das Tot-Volumen;

G die Radialbeschleunigung durch Zentrifugation [siehe Gleichung (10)]; und andere Parameter sind identisch mit Gleichung (1).

Aufgrund der kombinierten Auswirkungen von Größe und Dichte ist eine Trennung von Bestandteilen mit ähnlicher Größe, aber unterschiedlicher Dichte möglich. Ähnlich ist eine signifikante Erhöhung der Peak-zu-Peak-

Auflösung mit der CF3 im Vergleich zur AF4 möglich, obwohl der Bereich der Analytgröße und -art begrenzter ist (erfordert z. B. Materialien mit einer Dichte, die sich ausreichend von dem suspendierenden Medium unterscheidet).

Die Messmöglichkeiten der CF3 basieren auf einer theoretischen Beziehung zwischen Retentionsvolumen, V_r und Partikelgröße:

$$V_r = \frac{V_0}{6\lambda [\coth(1/2\lambda) - 2\lambda]} \approx \frac{V_0}{6\lambda} \quad (8)$$

Für die CF3 kann der Retentionsparameter [2] [3] als ausgedrückt werden:

$$\lambda = \frac{6kT}{\pi\Delta\rho G d_p^3} \quad (9)$$

wobei andere Terme wie zuvor definiert sind und G gegeben ist durch:

$$G = (2\pi \times RPS)^2 r \quad (10)$$

Dabei ist

RPS die Winkelgeschwindigkeit, ausgedrückt in Umdrehungen je Sekunde; und

r der Rotationsradius des kreisförmigen Kanals.

Wie bei der AF4 ist der Retentionsparameter ein empirisch bestimmter Schlüsselwert in Bezug auf das Retentionsverhältnis, und es gilt die gleiche Beziehung in Gleichung (3). Die Bewertung der Retentionszeiten der zurückgehaltenen Bestandteile liefert ein Kontinuum quantitativer Werte von d_H , was eine Verteilung der Bestandteilgrößen ergibt. Da höhere Retentionszeiten die Auflösung erhöhen, während geringere Retentionszeiten die Auflösung verringern, sollte die RPS entsprechend angepasst werden.

CF3 erfordert eine Relaxationszeit sowie die Fokussier- und Relaxationsschritte der AF4. Während der Relaxationszeit ist ein Stop-Flow-Verfahren erforderlich, damit jede Probenkomponente eine Gleichgewichtsverteilung in der Nähe der Akkumulationswand ausbildet. Das Zentrifugalfeld bewirkt, dass Bestandteile in Richtung der Akkumulationswand migrieren, und dieser Migration wirkt nach der Stokes-Einstein-Beziehung ein dispersiver Fluss entgegen. Im Gleichgewichtszustand sind die Diffusion der Bestandteile und die Zentrifugaleffekte ausgeglichen. Das Erreichen des stationären Zustands aus anfänglichen Verteilungen über die Kanaldicke wird bei der CF3 als Relaxation bezeichnet. Die theoretische Relaxationszeit wird vorhergesagt durch:

$$t_{eq} = \frac{18\eta w}{\Delta\rho G d_H^2} \quad (11)$$

wobei die Parameter wie zuvor festgelegt sind [25].

Nach Gleichung (11) hängt die Relaxationszeit auch mit dem Unterschied der Dichte zwischen den Bestandteilen und der Trägerflüssigkeit zusammen. Dies hat zur Folge, dass eine lange Relaxationszeit prinzipiell erforderlich ist, um bei kleinen Bestandteilen mit einem geringen Dichteunterschied zum flüssigen Medium eine angemessene Relaxation zu erzielen.

6 Entwicklung von Methoden für die AF4

6.1 Allgemeines

Die Anwendung der AF4 auf eine bestimmte Probe ist abhängig von den Eigenschaften der Probe, den eingesetzten Messgeräten und dem(den) Ziel(en) der Messung; die Entwicklung und Optimierung von Methoden ist in der Regel für jeden Probentyp oder jeden Satz von Bedingungen erforderlich. Aufgrund der Komplexität und des materialabhängigen Charakters der AF4 ist es nicht möglich, eine einzige allgemeingültige Methode

festzulegen, die für alle NOAA-haltigen Proben, Versuchsbedingungen und Zwecke anwendbar ist. Gelegentlich besteht das Ziel lediglich darin, Analyten für weitere Untersuchungen oder Anwendungen zu fraktionieren und zu sammeln; eine genaue Einstellung der Methode ist in diesem Fall möglicherweise nicht erforderlich oder notwendig. AF4-basierte Methoden werden auch verwendet, um unbekannte Proben auf ihre Qualität zu überprüfen, um beispielsweise festzustellen, ob sich eine Probe im Laufe der Zeit verändert hat oder sich von Charge zu Charge unterscheidet oder andere Komponenten als den Primäranalyten enthält; in diesem Fall darf eine einzelne Methode wiederholt angewendet werden, nachdem sie für ihren Zweck validiert wurde, beispielsweise im Hinblick auf Wiederholpräzision, Präzision unter Zwischenbedingungen und Empfindlichkeit. In den meisten Fällen besteht das Ziel darin, die NOAA hinsichtlich Größe, Form, Konzentration, Agglomerationszustand usw. zu fraktionieren und zu charakterisieren, häufig bei Proben, die unbekannt, modifiziert oder komplexer Art sind. Die Anleitungen in 6.2 bis 6.4 dienen dazu, die Hauptbestandteile der Methodenentwicklung zusammenzufassen und die Parameter und Bedingungen festzulegen, die zur Entwicklung, Optimierung und Validierung einer Methode erforderlich sind.

6.2 Probenfestlegungen

Die folgenden Faktoren können die Qualität der Fraktionierung und die Genauigkeit der Ergebnisse wesentlich beeinflussen:

- Konzentration oder Menge (Masse) des injizierten Analyten;
- Oberflächenladung;
- Oberflächenbeschichtung;
- Kernmaterial;
- Größe und Form;
- Vorhandensein anderer Bestandteile, einschließlich Partikel und lösliche Spezies.

Es sollte ausreichend Material vorhanden sein, um ein angemessenes Signal-Rausch-Verhältnis des Detektors (wie vom Hersteller festgelegt) zu erzielen, wobei eine Überladung des Kanals mit Probe zu vermeiden ist, welche zu abweichendem (gedämpft oder koeluierend) Retentionsverhalten und mangelhafter Wiederfindung führen kann. Für sphärische Nanoobjekte wird ein Bereich von etwa 10^7 bis 10^{11} insgesamt injizierter Partikel empfohlen [8], die Validierung der Probenmenge sollte jedoch als Teil jedes Optimierungsprozesses durchgeführt werden und ist kanalabhängig. Das Ziel besteht darin, einen Konzentrationsbereich und ein Injektionsvolumen zu ermitteln, die konsistente Retentions- und Wiederfindungsergebnisse ergeben, wobei die Konsistenz auf der Grundlage eines gültigen statistischen Ansatzes benutzerdefiniert werden kann (z. B. 95 % Konfidenzintervall oder innerhalb von $\bar{x} \pm \sigma$, wobei σ die Standardabweichung des Mittelwertes ist).

Als Faustregel sollte die Analytenkonzentration etwa 1 mg/ml nicht überschreiten; dieser Wert stellt nur eine „Schätzwert“-Obergrenze dar, um den Optimierungsprozess einzuleiten, und die tatsächlichen optimalen Konzentrationen können weitaus niedriger liegen. Das Probenvolumen wird durch die Probenschleife am Injektor bestimmt; Schleifen unterschiedlicher Größe (d. h. mit unterschiedlichen Volumina) können zur Steuerung des Injektionsvolumens ausgetauscht werden, oder es können Injektionsmengen, die kleiner als das Schleifenvolumen sind, manuell oder mit einem automatischen Probengeber injiziert werden, wenn die injizierte Menge mit ausreichender Genauigkeit bekannt ist. Manchmal ist es auch erforderlich, die Probe in ein kompatibles Medium zu verdünnen, das die Form oder Stabilität des Analyten nicht verändert. Ebenso ist es manchmal notwendig, den/die Analyten vor der Analyse zu konzentrieren (z. B. durch Rührzellen-Ultrafiltration oder Zentrifugation). Einer der ersten Schritte zur Optimierung sollte die Injektion einer Reihe von Analytenmengen sein, um die Detektorreaktion und die Wiederfindung/den Verlust zu bewerten. Dies kann unter „Standard“-Bedingungen oder mit typischen Einstellungen im mittleren Bereich für Flussraten und einer einfachen mobilen Phase erreicht werden, die so gewählt wird, dass sie mit bekannten Eigenschaften des Analyten kompatibel ist (siehe 6.3).

Die Oberflächenladung kann die Wechselwirkungen zwischen Analyten und Membran wesentlich beeinflussen und sich auf das Retentionsverhalten auswirken. Allgemeine handelsübliche Membranen (Polyethersulfon, regenerierte Cellulose) tragen in wässrigen Medien eine negative Restoberflächenladung. Nanoobjekte mit einer positiven Oberflächenladung (z. B. basierend auf der Messung des Zetapotenzials bei relevanten pH-Werten) haften an der Membran, was zum Verlust des Analyten führt. Umgekehrt weisen negativ geladene Analyten abstoßende Wechselwirkungen auf, die die Rückgewinnung erhöhen, allerdings auch zu einer unzureichenden Retention und folglich zu einer mangelhaften Fraktionierung führen können, wenn sie nicht richtig ausgeglichen sind. Der Optimierungs- und Validierungsprozess sollte diese Faktoren berücksichtigen; zu den Optionen gehören die Auswahl einer geeigneten Zusammensetzung der mobilen Phase (siehe 6.3), die Auswahl eines geeigneten Membranmaterials oder die Modifizierung der Membranoberfläche und die Änderung der Flussbedingungen, um ein akzeptables Gleichgewicht zwischen Wiederfindung, Retention und Selektivität zu erhalten.

Beschichtungen auf der Oberfläche von Nanoobjekten können die Wechselwirkungen mit der Membran und die Retention beeinflussen, da sie eine Oberflächenladung weitergeben, die Membrananhaftung verringern oder erhöhen oder Stabilität hinsichtlich der Agglomeration während der Injektion, Fokussierung und Relaxation bieten können.

Darüber hinaus beeinflussen das Kernmaterial des Nanoobjekts, seine Größe und seine Form die Retention. Größen- und Formtrennung sind häufig primäre Ziele der AF4, während das materialabhängige Retentionsverhalten ein Vorteil oder eine Erschwernis sein kann. Nanoobjekte eluieren allgemein mit einer Retentionszeit, die unabhängig von ihrer Form umgekehrt proportional zu ihrem Diffusionskoeffizienten ist.

6.3 Festlegungen zur mobilen Phase

Die Zusammensetzung der mobilen Phase ist eine Schlüsselvariable in der AF4 und sollte sowohl zur Sicherstellung der Kompatibilität mit dem Analyten als auch zur Optimierung der Betriebsleistung ausgewählt werden. Die Eigenschaften der mobilen Phase (Zusammensetzung, Ionenstärke und pH-Wert) sollten als Teil des Optimierungs- und Validierungsprozesses festgelegt werden.

Bei Nanoobjekten, die eine elektrostatische Nettoladung tragen, wird idealerweise die Zugabe einer kleinen Menge (z. B. Bereich von 0,5 mmol/l bis 5 mmol/l) Elektrolyt zur mobilen Phase empfohlen, um die Analyten-Membran-Wechselwirkungen zu modulieren. Zu diesem Zweck werden üblicherweise inerte Elektrolyte wie Ammoniumnitrat oder Natriumchlorid verwendet, die in der Regel zu ähnlichen Ergebnissen führen. Entionisiertes Wasser ohne Zusatz von Elektrolyten wurde auch erfolgreich zur Fraktionierung einiger Analyten verwendet. Natriumazid, ein Biozid, hat in AF4-Systemen³ ebenfalls eine Doppelfunktion als ein Elektrolyt und als ein antimikrobielles Mittel erfüllt. Allerdings kann die Verwendung von Azid eine Gefährdung und ein Problem bei der Abfallentsorgung darstellen, das bei einer langfristigen Verwendung bewertet werden sollten.

Im Allgemeinen sollte die Verwendung von hochkonzentrierten Elektrolytlösungen wie isotonischer Kochsalzlösung oder phosphatgepufferter Kochsalzlösung, vermieden werden. Sofern für spezifische Anwendungen erforderlich, muss der Analytiker vor der Durchführung der Fraktionierung⁴ die Stabilität der Analyten in diesen Lösungen bewerten. Zusätzlich können sich der Brechungsindex und/oder die Viskosität dieser Lösungen erheblich von einer verdünnten wässrigen mobilen Phase unterscheiden, was Online-Messungen (z. B. Größenanalyse durch DLS) beeinträchtigen kann.

Stark anziehende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Analyten und der Membranoberfläche können durch die Zugabe von entsprechend geladenen Tensiden (z. B. positiv geladenes CTAB oder negativ geladenes SDS) zur mobilen Phase abgeschwächt werden. Um die Bildung von Mizellen zu vermeiden, die die Trennung und Analyse des Zielanalyten beeinträchtigen können, sollten Tenside auf einem Niveau verwendet werden, das weit unter ihrer kritischen Mizellenkonzentration liegt. Tenside sollten ebenfalls nur dann verwendet werden, wenn die Wechselwirkungen des Tensids und des Analyten bekannt sind. Die Kombination

3 Natriumazid absorbiert Licht bei 254 nm und kann bei UV-Absorptionsmessungen Störungen verursachen.

4 Die Verwendung von mehrwertigen Ionen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+}) und bestimmten Puffern kann die Bildung von Agglomeraten verstärken.

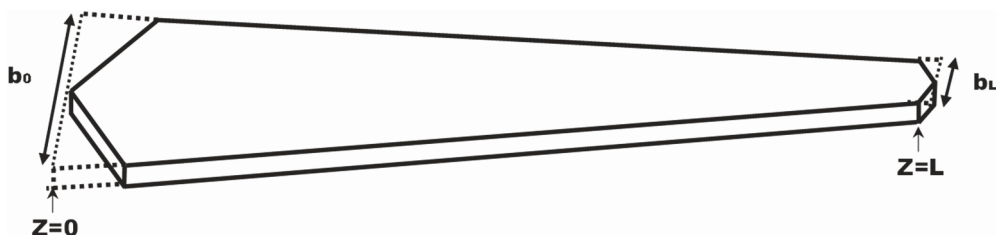
eines inerten Elektrolyten mit einem geeigneten Tensid hat sich als ein effizienter und erfolgreicher Ansatz zur Optimierung der mobilen Phase erwiesen, wenn entgegengesetzt geladene Analyten und Membranen vorliegen.⁵

Zusätzlich zur Vereinfachung einer akzeptablen Fraktionierung einer Probe kann die mobile Phase weiter angepasst werden, um die Trennleistung hinsichtlich R , R_s , S , und $R\%$ zu verbessern [8]. Im Allgemeinen sollte die Gesamtionenstärke (einschließlich der Beiträge des Tensids, sofern vorhanden) unter etwa 2 mmol/l gehalten werden, um den Analytenverlust durch das „Aussalzen“ geladener Spezies zu minimieren. Zunächst können die Ionenstärke und Zusammensetzung variiert werden, um eine optimale mobile Phase zu erhalten, indem feste Werte für die mittlere Flussrate verwendet werden (z. B. $\dot{V} = 0,5$ ml/min und $\dot{V}_c = 0,3$ ml/min bis 1 ml/min). Der pH-Wert der mobilen Phase kann ein wichtiger Parameter sein, insbesondere für Nanoobjekte, die auf natürliche Weise protolysierbare Stellen enthalten oder mit diesen beschichtet sind. Jegliche Vorkenntnisse über den Analyten und sein Suspensionsmedium werden die Auswahl und Optimierung der mobilen Phase wesentlich beschleunigen.⁶

6.4 Fraktionierung

6.4.1 Kanal- und Membranauswahl

Die derzeit für die AF4 verwendeten Kanäle haben überwiegend eine trapezförmige Form, wobei sich die Breite vom Einlass bis zum Auslass verengt (siehe Bild 3). Im Vergleich zu einem einfachen rechteckigen Kanal (d. h. konstante Breite entlang der z-Achse) kompensiert diese Geometrie die Verringerung der Kanalflussgeschwindigkeit entlang der Länge des Kanals aufgrund des Strömungsverlusts durch die Membran.



Legende

- L Kanallänge von Spitze zu Spitze
- b_0 Breite des Kanaleinlasses
- b_L Breite des Kanalauslasses

Bild 3 — Darstellung einer trapezförmigen Kanalgeometrie. Übernommen von Litzen und Wahlund 1991 [22]

Ein trapezförmiger Kanal bietet einen gleichmäßigeren Querfluss entlang der Länge des Kanals, minimiert die Analytenverdünnung und reduziert die Bandenverbreiterung aufgrund unterschiedlicher axialer Zonen- geschwindigkeiten in den parabolischen Stromlinien [26].

Die Maße des trapezförmigen Kanals werden durch die Länge von Spitze zu Spitze (L), die Dicke (w), die Breite des Kanaleinlasses b_0 und die Breite des Kanalauslasses b_L festgelegt, wie in Bild 3 dargestellt; b_z (nicht dargestellt) ist die Breite am Fokuspunkt entlang der z-Achse des Kanals.

5 Tenside und Additive können eine wesentliche Anzahl von festen Partikeln enthalten und/oder durch Staubpartikel aus der Umgebung verunreinigt sein. Daher wird empfohlen, die vorbereitete mobile Phase durch eine Membran mit einer Nennporengröße von 0,1 μm zu führen, um die Bildung von Verstopfungen in den FFF-Schlauchverbindungen oder -Ventilen zu vermeiden.

6 Die Empfehlungen des Herstellers zur pH-Kompatibilität mit den Messgerätebauteilen müssen befolgt werden.

Die Kanalauswahl (d. h. Nenndicke, Breite und Kanallänge, wie durch einen Abstandseinsatz aus Kunststoff oder eine vorgegebene feste Kanalauslegung festgelegt) ist eine notwendige Überlegung im Optimierungsprozess, wenn eine optimale Selektivität erforderlich ist. Bei Nanoobjekten mit maximalen Maßen im Größenbereich im Nanomaßstab funktioniert eine relativ große Kanaldicke (z. B. 350 µm) unter den meisten Versuchsbedingungen gut. Die Eigenschaften der Probe selbst können jedoch eine größere oder wahrscheinlicher eine kleinere Kanaldicke vorschreiben. Es gelten die folgenden Leitsätze:

Eine Vergrößerung der Kanaldicke:

- führt aufgrund des erhöhten Kanalvolumens zu einer größeren Verdünnung der Probe;
- führt zu einer größeren Verbreiterung der Analytenbänder aufgrund der axialen Verteilung über Strömungslinien, deren Geschwindigkeit variiert;
- ergibt eine bessere Fraktionierung mit höherer Auflösung oder Selektivität, da das laminare Flussprofil über eine größere Distanz erweitert wird; dies ermöglicht den Analyten mehr Zeit, sich in Grundgesamtheiten unterschiedlicher Größe zu trennen; und
- ergibt erhöhte Retentionszeiten.

Eine Verringerung der Kanaldicke:

- ergibt schmalere Analytenbänder mit weniger Verbreiterung;
- führt zu weniger Verdünnung der Probe; und
- ergibt eine geringere Qualität und Selektivität der Fraktionierung.

Wenn alle Punkte gleich sind, positioniert z. B. eine Erhöhung der Kanaldicke den Analyten an einem niedrigeren Punkt im parabolischen Geschwindigkeitsprofil, wodurch die Verweilzeit im Kanal erhöht wird. Dies wiederum beeinflusst die Fraktionierung, die Wiederfindung und die Retentionszeit. Dies sind allgemeine Leitsätze. In der Praxis beeinflusst die Einstellung der Flussbedingungen ebenso wie die Eigenschaften des Analyten selbst die Qualität der Fraktionierung und die Verbreiterung der längsgerichteten Bande. Daher sollten die Kanaldicke und die Flussraten in Abständen variiert werden, um akzeptablen Leistungskriterien zu entsprechen.

Die Kanallänge liegt typischerweise im Bereich zwischen etwa 100 mm und 300 mm. Kürzere Kanäle bieten eine schnellere Elution mit weniger Verdünnung und Bandenverbreiterung, während längere Kanäle eine bessere Fraktionierung ermöglichen können, insbesondere bei polydispersen Proben. Kanäle mit einer reduzierten Länge (z. B. 70 mm) sind kommerziell erhältlich; diese kürzeren Kanäle reduzieren die Probenverdünnung und die Analysezeit erheblich, während sie gleichzeitig die Nachweisgrenze verbessern, allerdings auf Kosten des Auflösungsvermögens [26] (dieser Kompromiss kann bei bestimmten Anwendungen angemessen sein).

Die Membranauswahl kann die Qualität der Fraktionierung und die Wiederfindung beeinflussen. Membranen werden üblicherweise auf der Grundlage eines Wertes für den „Molekulargewichtsgrenzwert“ (MWCO) klassifiziert, wobei die Werte für AF4-Anwendungen zwischen 1 kDa und 30 kDa liegen.⁷ Ein niedrigerer MWCO-Wert hält kleinere Analyten im Kanal zurück; höhere MWCO-Werte erlauben größeren Spezies, die Membran zu durchdringen und erzeugen weniger Widerstand gegen den Querfluss. Mit abnehmendem MWCO steigt der Kanaldruck mit der Flussrate schneller an. Ein MWCO-Wert von 10 kDa eignet sich für die meisten Nanoobjekt-Anwendungen, allerdings sollte die Wahl der Porengröße immer dementsprechend für die Verwendung mit

7 Der Begriff „Molekulargewicht“ ist veraltet, wird in der Industrie allerdings noch immer häufig zur Definition der Membranporengröße verwendet. Der korrekte Begriff, relative Molekülmasse, ist dimensionslos, wird aber in Einheiten von Dalton (Da) angegeben, dem Symbol für die vereinheitlichte atomare Masseneinheit, die numerisch 1 g/mol entspricht. Die internationale Generalkonferenz für Maß und Gewicht (CIPM) hat Da als eine nicht-SI-Einheit kategorisiert, die zur Verwendung mit dem SI akzeptiert wird.

einer bestimmten Probe validiert werden (z. B. durch Bestimmung der Wiederfindung). Membranen aus regenerierter Zellulose (RC) und Polyethersulfon (PES) werden aufgrund ihrer Verfügbarkeit als vorgeschnittene Einsätze für bestimmte Kanalgeometrien seitens der Messgerätehersteller sowie der großen Vielfalt verfügbarer MWCO-Werte für die überwiegende Mehrheit der Anwendungen verwendet. Allerdings stehen auch andere Membranmaterialien zur Verfügung (z. B. Polyvinylidendifluorid, Cellulosetriacetat), entweder vorgeschnitten von den Messgeräteherstellern oder als Bögen aus kommerziellen Bezugsquellen. Über den Handel beschaffte Bögen sollten vom Anwender sorgfältig auf die festgelegte Kanalgeometrie zugeschnitten werden, wenn möglich nach einem vom Hersteller des Messgerätes bereitgestellten Verfahren. Die Qualität der Membran ist entscheidend für eine gute Leistung, und die vom Anbieter gelieferten vorgeschnittenen Membranen werden üblicherweise auf ihre Qualität hin bewertet. Sowohl RC als auch PES sind hydrophil und weisen eine geringe Proteinbindung auf, während PES eine relativ höhere Flussleistung aufweist. Typischerweise tragen RC- und PES-Membranen eine negative Restoberflächenladung, die in Bezug auf den Analyten bei der Methodenentwicklung und der Formulierung der mobilen Phase berücksichtigt werden sollte.

Eine alternative Konfiguration oder Betriebsart ist der so genannte „Split-Flow-“ oder „Slot-“Auslass an einem ansonsten typischen trapezförmigen Kanal. In diesem Fall wird der aus dem Kanal austretende Flüssigkeitsfluss in zwei Ströme aufgeteilt. Ein analytenfreier Strom tritt nahe der Abreicherungswand (an der Oberseite des Kanals) aus und wird über einen zusätzlichen Auslassanschluss entfernt, der am oberen Block des Kanals in der Nähe des Hauptkanalauslasses eingebaut ist. Gleichzeitig tritt der analytenhaltige Flussstrom, der weiter von der Abreicherungswand entfernt ist, über einen Anschluss am Ende des Kanals (d. h. über den primären Kanalauslass) aus dem Kanal aus. Dieser letztere Fluss wird direkt an die angeschlossenen Detektoren weitergeleitet, während der „Split-Flow“ zum Abfall geleitet wird. Der „Split-“ oder „Slot-“Betrieb kann die Empfindlichkeit der Detektion erheblich verbessern, indem er zu einem konzentrierteren Analytenfluss (weniger Verdünnung) führt. Er kann auch anstelle eines „Standard-Flussteilers“ (nach dem Kanal) verwendet werden, um gegebenenfalls die Flussrate zu reduzieren, die den Detektor erreicht, ohne den Nachteil des Probenverlusts. Es sollte darauf geachtet werden, dass kein Probenverlust durch den „Slot-“Auslass und keine Verzerrung der Peakform entsteht, die die Auflösung beeinträchtigen könnten.

Hohlfaserfluss-FFF (HF5) wird hauptsächlich für die Analyse von Proteinen und andere bioanalytische Anwendungen eingesetzt, bei denen eine geringe Probenmenge ein einschränkender Faktor ist. HF5 enthält einen zylindrischen Kanal mit einer semipermeablen Hohlfaserschale und verwendet einen radial angelegten Querfluss. Dies hat die Vorteile eines reduzierten Kanalvolumens (geringere Probenverdünnung) und einer hohen Querflussdichte (schnelle Trennungen). Sie lässt sich in einfacher Weise für die Sammlung und Analyse von gelösten Spezies durch sorgfältige Auswahl der Membranporengröße und Sammlung des Filtrats während der Fokussierung anpassen. HF5 hat daher die Fähigkeit, Nanoobjekte von gelösten Spezies mit minimaler Probenverdünnung zu trennen. Ihre Anwendung wurde beispielsweise an Proben nachgewiesen, die Ag-Nanoobjekte im Gleichgewicht mit einer Reihe von gelösten Ag-Spezies enthalten [27]. Allerdings wird HF5 derzeit nicht routinemäßig für die Analyse von Nanoobjekten eingesetzt und liegt außerhalb des Anwendungsbereichs dieses Dokuments.

Andere Kanalgeometrien und -auslegungen (z. B. flacher Kanal mit exponentiell abnehmender Breite) wurden in der Literatur beschrieben oder sind für bestimmte Messgeräteplattformen verfügbar, allerdings werden sie nicht routinemäßig verwendet und liegen außerhalb des Anwendungsbereichs dieses Dokuments.

6.4.2 Injektion und Relaxation

Eine AF4-Analyse wird begonnen, wenn die Probe in den Kanal injiziert wird. Abhängig von Kanal- und Messgeräteauslegung kann die Injektion über einen separaten Injektionsanschluss oder über den Haupteinlassanschluss am vorderen Ende des Kanals erfolgen. Zu Beginn ist die Probenanalytwolke über die Tiefe des Kanals verteilt. Bevor die Fraktionierung beginnen kann, wird ein Relaxationsprozess angewendet. Dieser Prozess erfolgt während des Fokussierungsschritts, bei dem der Analyt in der mobilen Phase ins Gleichgewicht gebracht wird und in ein schmales Band nahe der Akkumulationswand des Kanals fokussiert wird. Die Dauer des Fokussierungsschritts hängt davon ab, ob der Injektions- und der Einlassfluss durch getrennte Anschlüsse (die zwei Relaxationsschritte erfordern) oder durch einen gemeinsamen Anschluss (der einen einzigen Relaxationsschritt erfordert) erfolgen, sowie von der Querflussrate, die beim Fokussieren erzeugt wird. Eine einfache Beziehung kann verwendet werden, um die erforderliche minimale Relaxationszeit (Fokussierungszeit), τ , in Minuten, zu schätzen [28]:

$$\tau = 1,2 \frac{V_0}{\dot{V}_c} \quad (12)$$

Während der Fokussierung strömt die mobile Phase von gegenüberliegenden Enden in den Kanal ein und tritt durch die permeable Akkumulationswand aus. Der Fokussierungspunkt im Kanal kann durch Ausgleich der entgegengesetzten Flussraten eingestellt und mit einer gefärbten (z. B. blaues Dextran oder Goldnanopartikel) zurückgehaltenen Spezies visualisiert werden. Das gewünschte Ergebnis der Fokussierung/Relaxation ist ein schmales symmetrisches Band, das den/die Analyten enthält und das über die gesamte Dicke des Kanals ins Gleichgewicht gebracht ist.

Wenn die Beladung mit der Probe zu hoch ist oder die Abstoßungskraft nicht ausreicht, um die Stabilität der Nanoobjekte in der mobilen Phase aufrechtzuerhalten, kann die Fokussierung zur Agglomeration des Analyten und einem Probenverlust aufgrund von Membranwechselwirkungen führen. In diesem Fall sollte der Analytiker in Betracht ziehen, die injizierte Probenmenge zu verringern, die mobile Phase entsprechend 6.2 zu modifizieren (z. B. mit Tensiden) oder die Probe vor der Injektion zu modifizieren (z. B. mit einer stabilisierenden Oberflächenbeschichtung).

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung eines Fritten- oder Dispersionseinlasskanals, der die Konzentrationsspannung auf die Probe reduziert [29]. In diesem Fall wird die hydrodynamische Relaxation der Probe durch die kompressive Wirkung eines kontinuierlichen Injektionsflusses durch die Fritte (en: stop-less frit flow) erreicht und die Notwendigkeit der Fokussierung umgangen, wodurch unerwünschte Wechselwirkungen des Analyten mit der Membran abgeschwächt werden. Als Folge des kontinuierlichen Injektionsflusses durch die Fritte ist die relaxionale Bandenverbreiterung im Vergleich zur herkömmlichen AF4 mit Fokussierung erhöht [30]. Die Verwendung des Fritteneinlasses kann dazu beitragen, Störungen von Analyten zu verhindern, die unter dem Einfluss der bei der Fokussierung aufgebrachten Kräfte physikalisch instabil sind [31].

6.4.3 Optimierung der Flussbedingungen

Sobald eine anfängliche mobile Phase und die Analytenkonzentration (Nanoobjektmenge) ausgewählt oder empirisch bestimmt wurden, sollte die Kanalflussrate $\dot{V}$ innerhalb des Bereichs (0,5 bis 1,0) ml/min festgelegt werden. Unterhalb 0,5 ml/min kann eine langsame Elutionsgeschwindigkeit zu einem wesentlichen Verlust des Analyten führen (mangelhafte Wiederfindung), während oberhalb von 1,0 ml/min der Kanaldruck schnell ansteigt, da ein hoher $\dot{V}_c$ erforderlich ist, um sehr kleine Analyten zu fraktionieren, wodurch der verfügbare experimentelle Bereich eingeschränkt wird. Anschließend sollte ein $\dot{V}$ im mittleren Bereich gewählt werden, um zu bewerten, ob Fraktionierung und Wiederfindung angemessen sind (d. h. Bestandteile zumindest teilweise aufgelöst sind und $R\% \geq 70\%$). Zusätzlich sollte das Nichtvorhandensein von nicht zurückgehaltenen Analyten (die sich innerhalb des Totzeit-Peaks befinden) bestätigt werden. Sobald diese Bedingungen erfüllt sind, sollte, beginnend mit einem niedrigen bis mittleren $\dot{V}_c$ im Bereich (0,5 bis 1,0) ml/min, $\dot{V}$ variiert werden, um $\dot{V}_c/\dot{V}$ so zu optimieren, dass $R\%$ maximiert wird, $0,03 \leq R \leq 0,2$ und S ungefähr gleich 1 ist. Wenn diese Leistungsparameter nicht auf annehmbare Niveaus optimiert werden können, darf die Kanaldicke nach 6.4.1 geändert werden. Alternativ kann die FFF-Theorie direkt hinzugezogen werden, um einen geeigneten Anfangssatz an Flussbedingungen auszuwählen. Handelsübliche Software darf, sofern verfügbar, verwendet werden, um diesen Prozess zu erleichtern. Theoretisch abgeleitete Flussbedingungen sollten experimentell validiert werden.

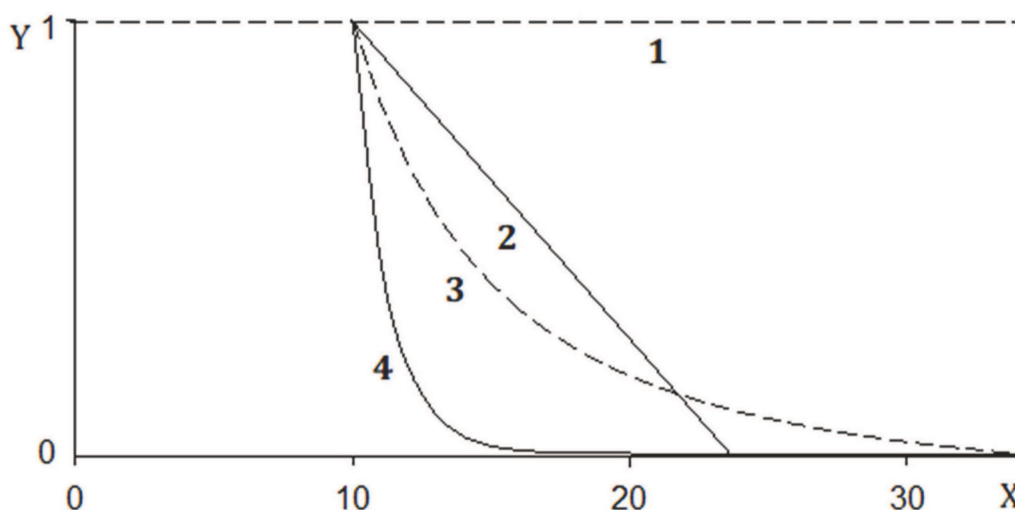
6.4.4 Elutionsprogramm

Obwohl die Entscheidung, einen konstanten Querfluss ($\dot{V}_c$ feststehend) gegenüber einer Programmierung des Querflusses ($\dot{V}_c$ Reduktionsgradient) zu verwenden, nicht durch die Notwendigkeit definiert ist, die Partikelgröße auf der Grundlage der Retentionszeit zu bestimmen, führt ein programmierter Abfall des Querflusses zu einer zusätzlichen Komplikation (d. h. bei einem variablen Querfluss ist ein Diskretisierungsalgorithmus erforderlich [32] [33]). Wenn der dynamische Bereich der zu trennenden Bestandteilgrößen klein ist (z. B. Monomer-Dimer-Trennung), sollte ein konstanter Querfluss angewendet werden. Viele Anwendungen decken einen breiten Größenbereich ab, und daher ist ein Abfall des Querflusses während der Elution vorteilhaft, um eine schnelle Elution mit einer akzeptablen R_s (d. h. dabei ist $R_s > 1$) zu ermöglichen. Die Elutionsprogrammierung ist insbesondere hilfreich für hochgradig polydisperse oder multimodale Proben, bei denen eine große

Bandbreite an Bestandteilgrößen vorhanden ist; in diesem Fall kann ein konstanter Wert für $\dot{V}_c$ unpraktisch sein, da er zu einer übermäßigen und unnötig langen Elutionszeit führt.

Es können je nach den spezifischen Umständen und den verfügbaren Optionen für ein bestimmtes handelsübliches Gerät verschiedene Elutionsprogramme verwendet werden, wobei bei Bedarf das Prinzip Versuch und Irrtum angewendet werden darf, um den optimalen Ansatz auszuwählen. Programme folgen typischerweise einem von vier Modi (siehe Bild 4): (1) Konstantmodus (keine Änderung in $\dot{V}_c$), (2) zeitverzögertes lineares Programm ($\dot{V}_c$ anfänglich für einen Zeitraum t_1 konstant gehalten, gefolgt von einem linearen Abfall auf null), (3) zeitverzögertes Potenzgesetz-Programm ($\dot{V}_c$ anfänglich konstant gehalten, gefolgt von einem Potenzgesetz-Abfall auf null), und (4) zeitverzögertes exponentielles Programm ($\dot{V}_c$ anfänglich konstant gehalten, gefolgt von einem exponentiellen Abfall auf null). Die anfängliche Querflussrate in Bild 4 ist bei allen Abkling-Programmen bis zu 10 min konstant. In Abkling-Programmen werden die Elutionspeaks typischerweise für eine weitere Offline-Verwendung gesammelt und/oder von Online-Detektoren analysiert, die in der Lage sind, die Partikelgröße (z. B. DLS oder MALS) oder die Konzentration (z. B. UV-Vis oder ICP-MS) von Nanoobjekten zu bestimmen.

Um verwendet zu werden, muss ein gewünschtes Flussprogramm mit den Fähigkeiten und Einschränkungen des Messgeräts (z. B. Massenflussregler, Spritzenpumpen) kompatibel sein. Beispielsweise sind kleine Änderungen über einen großen $\dot{V}_c$ -Bereich bei den niedrigsten $\dot{V}_c$ -Werten unter Umständen nicht möglich. Der Anbieter des Messgeräts sollte hinsichtlich dieser Einschränkungen hinzugezogen werden.



Legende

- X Elutionszeit, in Minuten
- Y Querfluss, in willkürlichen Einheiten
- 1 Elution bei konstantem Querfluss
- 2 zeitverzögerter linearer Abfall
- 3 zeitverzögerter Potenzgesetz-Abfall
- 4 zeitverzögerter exponentieller Abfall

Bild 4 — Grafische Darstellung üblicher Elutionsprogramme

6.4.5 Verwendung der FFF-Theorie zur Auswahl der anfänglichen Flusseinstellungen

Die FFF-Theorie kann prinzipiell als Werkzeug bei der Planung von Experimenten und der Auswahl von Anfangsbedingungen und -parametern im Rahmen der Methodenentwicklung und des Optimierungsprozesses verwendet werden, einschließlich des programmierten Abfalls des Querflusses. Die Verwendung theoretischer Beziehungen zur Vorhersage optimaler Einstellungen für ein Experiment kann die Notwendigkeit von „Versuch und Irrtum“ minimieren. Sofern verfügbar, darf eine handelsübliche Software verwendet werden,

um diesen Prozess zu erleichtern, allerdings sollten die Einstellungen vom Anwender validiert werden, da nicht-ideale und materialspezifische Effekte den Fraktionierungsprozess beeinflussen können.

7 Entwicklung von Verfahren für CF3

7.1 Allgemeines

Wie bei der AF4 hängt die Anwendbarkeit der CF3 für eine bestimmte Probe von den Eigenschaften der Probe und dem(den) Ziel(en) der Messung ab. Daher ist es nicht möglich, eine einzige universelle Methode festzulegen, die auf alle Proben mit Nanoobjekten anwendbar ist. Um eine gute Trennung zu erreichen, sind die Wahl der mobilen Phase, die Feldstärke, das Abklingen des Feldes und die Relaxationszeit wichtig. Die in 7.2 bis 7.7 dargelegten Anleitungen sind dafür vorgesehen, die wesentlichen Bestandteile der Methodenentwicklung zusammenzufassen und die Parameter und Bedingungen festzulegen, die zur Entwicklung, Optimierung und Validierung einer Methode erforderlich sind.

7.2 Auswahl der mobilen Phase

Das Fehlen einer stationären Phase in der CF3 ermöglicht die Verwendung einer Vielzahl von wässrigen mobilen Phasen in einem weiten Ionenstärke- und pH-Wert-Bereich. Allerdings ist eine passende Einstellung des pH-Wertes und der Ionenstärke der mobilen Phase notwendig, um Wechselwirkungen zwischen Probe und Wand und eine Agglomeration der Probe zu vermeiden. Wie zuvor erwähnt, kann eine mobile Phase mit sehr geringer Ionenstärke zu einer Abstoßung zwischen der Probenspezies und der Akkumulationswand führen, was wiederum zu einer frühen Elution der Probe führt. Die Verwendung einer mobilen Phase mit hoher Ionenstärke könnte aufgrund der Verringerung der elektrostatischen Abstoßung zu einer Anziehung zwischen der Probe und der Akkumulationswand führen, was letztendlich zu einer geringen Wiederfindung des Analyten führen könnte. Der pH-Wert der mobilen Phase sollte ebenfalls so eingestellt werden, dass Partikel-Wand-Wechselwirkungen minimiert werden. Als Faustregel gilt, den pH-Wert der mobilen Phase auf einen Wert oberhalb der isoelektrischen Punkte sowohl der Probe als auch der Akkumulationswand einzustellen, um eine Anziehung der Probe zur Wand oder zu anderen Partikeln zu vermeiden. Bei Nanopartikeln und Umweltkolloiden, die häufig negativ geladen sind, wird die Verwendung von anionischen Tensidlösungen wie SDS, Natrium-Pyrophosphat (SPP, en: sodium pyrophosphate) oder FL-70 (eine handelsübliche Formulierung, die nichtionische und ionische Tenside enthält) empfohlen. Bei positiv geladenen Kolloiden können kationische Tenside wie CTAB verwendet werden.

7.3 Auswahl der Feldstärke

Die optimale Feldstärke sollte zu einer hochauflösenden Trennung führen, ohne die Wiederfindung des Analyten zu beeinträchtigen [34]. Um eine hochauflösende Trennung zu erreichen, wird typischerweise ein Verhältnis der Retentionszeit des Analyten zur Totzeit (t_r/t_0) von 5 empfohlen. In der Praxis kann dieses Verhältnis allerdings bis auf 2 sinken, was zwar das Auflösungsvermögen der Methode für die Probe verringert, jedoch noch immer eine Trennung des Proben-Peaks vom Totzeit-Peak ermöglicht. Daher kann die erforderliche Feldstärke für die hochauflösende CF3 aus den entsprechenden Retentionsgleichungen abgeleitet werden. Letztendlich beinhaltet die Auflösung die Fähigkeit, Partikel unterschiedlicher Größen und/oder effektiver Massen zu fraktionieren.

Extrem hohe Feldstärken können zu starken Wechselwirkungen zwischen Analyt und Wand führen, und somit zu einer geringen Analyt-Wiederfindung oder einem Übergang vom Brownschen zum „lift-hyperlayer“-Modus führen. Eine Peak-Verbreiterung kann auch auftreten, wenn die Retentionszeiten zu lang sind, was die Qualität der Trennung verringern würde. Als Erfahrungswert gilt, dass t_r/t_0 kleiner als 20 sein sollte.

7.4 Programm für das Abklingen des Feldes

Bei Proben mit einer breiten Größenverteilung oder Proben, die Partikel enthalten, deren Größen weit auseinander liegen, kann die Retentionszeit für die zuletzt eluierenden Partikel bei Anlegen eines konstanten Feldes übermäßig lang sein, insbesondere bei CF3-Trennungen im Brownschen Modus (Elution im Normalmodus). Dies kann nicht dadurch gelöst werden, dass einfach die Feldstärke reduziert wird, da die kleinsten Partikel mit dem Totzeit-Peak zusammenfallen können. Um die Laufzeit zu reduzieren, wird das angelegte Feld so pro-

grammiert, dass es während des Durchlaufs mit der Zeit abklingt. Diese Programmierung für das Abklingen des Feldes ermöglicht es, die kleinsten Partikel aus dem Totzeit-Peak aufzulösen und größere Partikel schneller aus dem Kanal zu eluieren, was zu einer verkürzten Laufzeit führt. Um ein gleichmäßiges Fraktionierungsvermögen sicherzustellen, sollte die Feldstärke mit einem Potenzgesetz-Programm reduziert werden [35]:

$$RPS(t) = RPS_0 \left(\frac{t_1 - t_a}{t - t_a} \right)^4 \quad (13)$$

Dabei ist

$RPS(t)$ die Rotationsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t ;

RPS_0 die Rotationsgeschwindigkeit während der Anwendung des konstanten Feldes;

t_1 die Zeitspanne des konstanten Feldes vor dem Abklingen des Feldes; und

$t_a = -8 \times t_1$.

Die Gleichungen für die FFF mit Elution im Normalmodus sind nicht gültig, wenn während der Fraktionierung eine Programmierung verwendet wird. In diesem Fall erfolgt die Umrechnung der Retentionszeit in eine Größe entweder durch umfangreiche Berechnungen, die in die Software zur Probenverarbeitung integriert sind, oder durch direkte Kalibrierung mit Materialien bekannter Größe und Dichte.

7.5 Auswahl der Kanalflussrate

Die Kanalflussrate beeinflusst sowohl die Gesamtlaufzeit als auch die Auflösung bezüglich des Analyten. Die Auflösung kann verbessert werden, indem die Kanalflussrate gesenkt wird, wodurch die Peakverbreiterung bei Nichtgleichgewicht minimiert wird. Allerdings erhöht dies zwangsläufig die Laufzeit. Typischerweise werden im Brownschen Modus Kanalflussraten im Bereich von 0,3 ml/min bis 2 ml/min verwendet. Bei Proben mit einer breiten Größenverteilung sollten hohe Kanalflussraten vermieden werden, um die „lift-hyperlayer“-Störungen auf die größeren Partikel zu minimieren.

Kanal- und Detektorflussraten sind nicht notwendigerweise gleich (z. B. könnte der Fluss nach dem Kanal geteilt werden) und deshalb dürfen diese Begriffe nicht austauschbar verwendet werden.

7.6 Berechnung der Relaxationszeit

Wie zuvor erläutert, ist ein Zeitraum vor der Elution erforderlich, um die Gleichgewichtsposition der Analytwolke über die Kanalhöhe hinweg zu bestimmen, in der die feld- und diffusionsverursachten Migrationen ausgeglichen sind. Für einen polydispersen Analyten wird die Relaxationszeit für den kleinsten Bestandteil der Verteilung berechnet und kann als die Zeit approximiert werden, die diese Partikel benötigen, um die Kanaldicke unter der angelegten Feldstärke zu durchqueren. Für die CF3 wird die Relaxationszeit aus Gleichung (10) [35] berechnet. Um eine vollständig relaxierte Probe in der CF3 sicherzustellen, wird eine Relaxationszeit empfohlen, die $1,5 \times$ länger ist als der berechnete Mindestwert.

7.7 Berechnung der Verzögerung der Probeninjektion

Vor Beginn der Relaxation sollte der Analytiker sicherstellen, dass der Probenpfropfen vollständig in den Kanal eingeführt ist. Daher sollte das Volumen zwischen dem Injektionsventil und dem Kanalinjektionsanschluss, V_i , genau bekannt sein. Dieses Volumen kann mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden, indem die Länge der Verbindungsleitung gemessen wird und ihr Innendurchmesser bekannt ist. Die Injektionsverzögerung, t_D , kann anhand einer einfachen Beziehung berechnet werden:

$$t_D = \frac{(V_i + V_l)}{\dot{V}_l} \quad (14)$$

Dabei ist

V_l das Probenschleifenvolumen; und

$\dot{V}_i$ die volumetrische Injektionsflussrate.

7.8 Verwendung der FFF-Theorie zur Auswahl der anfänglichen Einstellungen

Die FFF-Theorie kann prinzipiell als Werkzeug bei der Planung von Experimenten und der Auswahl von Anfangsbedingungen und -parametern im Rahmen der Methodenentwicklung und des Optimierungsprozesses verwendet werden, einschließlich des programmierten Abklingens des Feldes und der Relaxationszeit. Die Verwendung theoretischer Beziehungen zur Vorhersage optimaler Einstellungen für ein Experiment kann die Notwendigkeit von „Versuch und Irrtum“ minimieren. Sofern verfügbar, darf eine handelsübliche Software verwendet werden, um diesen Prozess zu erleichtern, allerdings sollten die Einstellungen vom Anwender validiert werden, da nicht-ideale und materialspezifische Effekte den Fraktionierungsprozess beeinflussen können.

8 Analyse von Nanoobjekten

8.1 Allgemeines

Die Analyse von Nanoobjekten unter Anwendung von AF4 oder CF3 hängt vom Ziel des Experiments, der Verfügbarkeit geeigneter Detektoren (online oder offline) und den Eigenschaften der Probe selbst ab. Typischerweise sind „Größe“ und „Konzentration“ von Nanoobjekten die häufigsten Messgrößen. Zusätzlich kann eine Bestimmung von Zusammensetzung oder Material gewünscht sein.

8.2 Online-Größenanalyse

Ein geeigneter Online-Detektor und eine entsprechende Methode sollten ausgewählt werden, um die Größe fraktionierter Nanoobjekte zu messen. Zu den gebräuchlichsten und am weitesten verbreiteten Verfahren gehören die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers anhand der Retentionszeit (nach Kalibrierung mit einem Material, das aus sphärischen Partikeln mit bekanntem Durchmesser besteht), die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers anhand DLS (typischerweise der z-gemittelte Durchmesser [36])⁸ und die Bestimmung des Trägheitsradius r_g anhand MALS-Daten (anwendbar für r_g größer als etwa 10 nm). Um einen bandverbreiternden Effekt bei der Größenbestimmung zu vermeiden, sollte das Volumen der Flusszelle für Online-Größenanalyseverfahren so klein wie möglich sein; ansonsten sollte eine Korrektur der Bandenverbreiterung durchgeführt werden. Eine direkte Messung der Größe durch DLS oder MALS ist, sofern geeignet, einer auf Retention basierenden Größenmessung vorzuziehen, da für erstere keine Kalibrierung erforderlich ist.

Die auf dem Retentionsverhalten basierende Partikelgrößenanalyse erfordert eine Kalibrierung der AF4-Retentionszeit, vorzugsweise mit sphärischen Partikeln bekannter Größe oder bekanntem Diffusionskoeffizienten, die mit dem Größenbereich des/der Analyten überlappen. Aus der so erstellten Kalibrierkurve kann der sphärisch-äquivalente hydrodynamische Durchmesser für jeden gemessenen Wert von t_R eines unbekannten Analyten zugewiesen werden. Zu diesem Zweck werden häufig sphärische Partikel aus Polystyrol-Latex (PSL) verwendet. Allerdings kann ein nicht-ideales materialspezifisches Retentionsverhalten das Kalibrierverfahren signifikant verzerren [38] [39]. Beispielsweise kann die Verwendung von sphärischen PSL-Partikeln ungeeignet sein, wenn dieser Wert dann zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten oder der hydrodynamischen Größe von Nanoobjekten mit einer wesentlich anderen Zusammensetzung oder Oberflächenbeschaffenheit (z. B. Goldnanopartikel) verwendet wird. Aus diesem Grund sollten sphärische

8 Die Kumulanten-Methode der DLS-Analyse liefert einen streulichtintensitätsgewichteten, harmonischen, mittleren Partikeldurchmesser, der häufig als „z-Mittelwert“ bezeichnet wird. Größen, die mit Methoden bestimmt werden, die auf unterschiedlichen Messprinzipien beruhen, führen zu unterschiedlichen Größenparametern, die sich auch nach einer Reduktion der Größenverteilung durch Fraktionierung erheblich unterscheiden können. Zum Beispiel spiegelt die durch DLS erhaltene Größe die hydrodynamischen Eigenschaften des Bestandteils wider, während der durch MALS erhaltene r_g der massengemittelter quadratischer Mittelwert (RMS) des Abstands des Materials vom Massenmittelpunkt ist.

Partikel bekannter Größe mit einer Zusammensetzung und Oberflächenchemie, die mit dem Analyten so genau wie möglich übereinstimmen, als Kalibriermittel verwendet werden.⁹

Alternativ ist es mit einem einzigen bekannten monodispersen sphärischen Partikel möglich, die effektive Kanaldicke, w_{eff} , zu ermitteln:

$$w_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{6Dt_R}{\ln\left(1 + \frac{V_c}{V}\right)}} \quad (15)$$

Sobald w_{eff} unter den Messbedingungen bestimmt wurde, kann sie anschließend in Gleichung (6) eingesetzt werden, um D für einen unbekannten Analyten zu bestimmen; die Größe wird durch Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung (siehe 5.2.1) unter Annahme einer sphärischen Geometrie erhalten. Der Nennwert der Kanaldicke, bestimmt durch den Abstandhalter oder einen vorgegebenen festen Kanal, kann aufgrund der Kompressibilität der Membran um 10 % oder mehr von der effektiven Dicke abweichen. Außerdem können die gleichen, zuvor erwähnten nicht-idealen Effekte bei Nanoobjekten der gleichen oder nahezu gleichen Größe zu signifikanten Abweichungen in der scheinbaren effektiven Dicke führen. Aus diesem Grund sollte w_{eff} , sofern möglich, mit einem Kalibriermittel bestimmt werden, das eng mit dem Zielanalyten übereinstimmt. Wenn dies nicht möglich ist, dann sollte die mögliche systematische Abweichung bei der Verwendung eines ungleichen Kalibriermittels berücksichtigt werden. Außerdem kann Gleichung (6) nicht direkt angewendet werden, wenn ein Elutionsprogramm verwendet wird, das über die Zeit einer variablen Querflussrate folgt. In diesem Fall ist ein Diskretisierungsalgorithmus erforderlich, um t_R auf die hydrodynamische Größe oder den Diffusionskoeffizienten zu beziehen, wie in 6.4.4 angegeben.

Bei der Messung der Größe mit DLS sollte der hydrodynamische Durchmesser über die FWHM für jeden auflösbaren eluierenden Peak gemessen werden. Die Qualität von Online-DLS-Daten nimmt signifikant ab, wenn sich nicht genügend Partikel im Strahl befinden (wie auf den Flanken eines eluierenden Peaks) oder wenn die Partikelgröße bis zu dem Punkt zunimmt, dass die Verweilzeit im Strahl nicht ausreicht, um die Korrelationsabklingfunktion der Partikel aufgrund des geringen Diffusionsvermögens mit hoher Genauigkeit zu erfassen. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser für einen Peak ist als arithmetisches Mittel der Datenpunkte zu berechnen, die wie zuvor beschrieben ermittelt wurden. Wenn die Daten jedoch eine deutliche ansteigende Tendenz aufweisen, ist es möglich, dass das arithmetische Mittel nicht den wahren Mittelwert für den Peak darstellt. Eine derartige Tendenz weist darauf hin, dass die Grundgesamtheit von Nanoobjekten innerhalb des Peaks polydispers ist, wobei größere Partikel nach kleineren aus dem Kanal austreten, so dass ihre relativen Anteile nicht richtig gewichtet sind. In diesem Fall sollte der Analytiker weiterhin den FWHM-Mittelwert angeben, aber die beobachtete Tendenz beachten.

Die Anwendung von MALS für die Größenanalyse von Nanoobjekten ist allgemein auf das untere Größenende beschränkt, wo eine Winkelabhängigkeit des Streulichts nicht mehr vorliegt (d. h. ein Trägheitsradius von ungefähr 10 nm für Detektoren, die rotes Licht verwenden). Die obere Größengrenze überschreitet den Nanomaßstab und hängt vom kleinsten Detektionswinkel ab. Der Trägheitsradius kann aus der Steigung ($r_g^2/3$) eines log-log-Diagramms der Streuintensität gegen q^2 erhalten werden, wobei $q = (4\pi n/\lambda_0) \sin(\theta/2)$ die Größe des Streuvektors, n der Brechungsindex des Mediums, λ_0 die einfallende Wellenlänge im Vakuum und θ der Streuwinkel ist. Dies wird allgemein als Guinier-Diagramm bezeichnet. Es gibt weitere Modelle zur Datenanpassung, einschließlich des weit verbreiteten Debye-Zimm-Formalismus; vollständige oder partielle Zimm-Diagramme werden üblicherweise für polymere Materialien verwendet, um sowohl die gewichts-gemittelte Molmasse als auch r_g zu extrahieren, allerdings nur, wenn die Massenkonzentration des Polymers bekannt ist und die MALS-Daten auf einen Streuwinkel von null extrapoliert werden können [40]. Wie beim Guinier-Diagramm ist es notwendig, dass die Polymergröße (Partikelgröße) groß genug ist, um eine winkelabhängige Streuung zu erzeugen.¹⁰

9 Da übereinstimmende Kalibriermittel nicht immer verfügbar sind und da Proben mehrere unterschiedliche Bestandteile enthalten können, ist die resultierende Partikelgröße auf der Grundlage der Retention bestenfalls ein grober Schätzwert des wahren Wertes (d. h. es könnte eine signifikante Verzerrung vorliegen).

10 Der Analytiker sollte sich auch bewusst sein, dass optisch aktive Nanoobjekte wie Gold eine Winkelabhängigkeit ergeben können, die mit der Guinier- oder Zimm-Analyse nicht kompatibel ist.

Eine sphärisch-äquivalente Größe kann durch einfache Transformation erhalten werden, $r = r_g/\sqrt{3/5}$, wobei r der geometrische Radius einer gleichwertigen massiven Kugel ist. Beziehungen bestehen für andere Geometrien, einschließlich Hohlkugeln, Zylinder, Rohre, Ellipsoide und Scheiben, die in der veröffentlichten Literatur leicht zugänglich sind [41]. In ähnlicher Weise ist das Verhältnis des Trägheitsradius (aus MALS) zum hydrodynamischen Durchmesser (aus DLS), $2r_g/d_H$, ein formempfindlicher charakteristischer Parameter, der als Formfaktor nach Burchard-Stockmayer bekannt ist, jedoch im Allgemeinen einfach als „Formfaktor“ bezeichnet wird [42]. Die Größenordnung dieses Parameters hängt von der Struktur des Analyten ab. Dieses Verhältnis nimmt mit zunehmender „Kompaktheit“ des Analyten ab. Zum Beispiel betragen die erhaltenen Verhältnisse für eine harte Kugel und einen langen dünnen Stab 0,778 bzw. $> 2,0$, wobei zwischen diesen Werten längliche und abgeflachte Ellipsoide liegen [43] [44]. Formfaktoren für Partikel (außer Makromoleküle) größer als etwa 1,5 deuten auf Morphologien mit höheren Aspektverhältnissen hin.

Bei Messungen auf optischer Basis hängt das Signalverhalten von der Menge der injizierten Probe und von den optischen Eigenschaften des Analyten ab. Die Detektorempfindlichkeit muss so eingestellt werden, dass das stärkste Peak-Signal für den Analyten erhalten wird, um eine genaue Datenverarbeitung sicherzustellen.

8.3 Online-Konzentrationsanalyse

8.3.1 Allgemeines

Ein geeignetes Online-Bewertungsverfahren sollte ausgewählt werden, um die Konzentration fraktionierter Nanoobjekte während der Elution zu messen, wenn für eine Anwendung Messungen der Konzentration erforderlich sind. Diese Analyse darf auf der Massen- oder Anzahlkonzentration basieren, ist aber häufiger massenbasiert. Da die Intensität des Streulichts sowohl von der Konzentration als auch von der Partikelgröße/-form abhängt, wird die Lichtstreu-Detektion nicht als bevorzugtes Bewertungsverfahren für die Online-Konzentrationsanalyse angesehen. Unter Bedingungen, bei denen die Größe/Form konstant (gleichförmig) ist, kann die Streuintensität allerdings direkt mit der Massen- oder Anzahlkonzentration der Streuteilchen in Beziehung gesetzt werden. Unabhängig davon sollte die Verwendung der Streuintensität zur Messung der Konzentration (oder der Wiederfindung der Masse) mit der gebotenen Sorgfalt und im Wissen um die möglichen Ungenauigkeiten erfolgen. Wenn die Streuintensität für derartige Zwecke verwendet wird, wird empfohlen, einen hohen Streuwinkel zu verwenden, der weniger empfindlich gegenüber Änderungen der Partikelgröße ist.

8.3.2 Massenbasierte Verfahren

Geeignete und häufig verwendete massensensitive Verfahren umfassen die optische UV-Vis-Absorption, ICP-OES und ICP-MS (siehe Literaturhinweise [45] bis [52]).

ICP-OES, ICP-MS und UV-Vis sind grundsätzlich empfindlich hinsichtlich der Masse des vorhandenen Analyten. ICP-OES und ICP-MS haben sehr niedrige Nachweisgrenzen (je nach Messgerät und Element bis in den ng/l-Bereich) und sind elementspezifisch. Die UV-Vis-Nachweisgrenzen hängen vom Absorptionsvermögen und den Streueigenschaften des Analyten ab und sind nicht elementspezifisch; UV-Vis erbringt die besten Ergebnisse bei optisch aktiven Materialien, die eine charakteristische Absorptionsbande (z. B. SPR) aufweisen oder bei denen nur eine einzige absorbierende Spezies vorhanden ist. Die Linearität der Absorption (Extinktion) sollte für den Analyten über den relevanten Konzentrationsbereich bestätigt werden. Zu den verfügbaren UV-Vis-Detektoren gehören Geräte, die eine einzelne wählbare Wellenlänge, mehrere wählbare Wellenlängen und eine Vollspektrumanalyse nutzen (z. B. DAD).

Für die elementspezifische Konzentration bieten ICP-MS und ICP-OES die höchste Spezifität und die niedrigsten Nachweisgrenzen. ICP-OES bietet simultane Multi-Element-Detektion (bis zu 60) im Spurenbereich; metallische und einige nichtmetallische Elemente können durch ICP-OES erfasst werden, begrenzt durch Emissionsinterferenzen. ICP-MS kann 83 Elemente im Spuren- und Ultraspurenbereich erfassen; und obwohl die Analysezeit sehr kurz sein kann, ist die Anzahl der verschiedenen gleichzeitig analysierbaren Elemente (über Peak-Hopping) im Allgemeinen auf wenige begrenzt. ICP-MS bietet die zusätzliche Fähigkeit zum Nachweis spezifischer Isotope desselben Elements, wodurch die Analyse des Isotopenverhältnisses ermöglicht wird. Wichtige leichte Elemente, insbesondere Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff, werden von MS oder OES üblicherweise nicht erfasst, und einige Elemente (z. B. Schwefel, Calcium, Selen) können relativ hohe Nachweisgrenzen

zen haben oder den zusätzlichen Einsatz einer Kollisions- oder Reaktionszelle erfordern. Zusätzlich gibt es bei der ICP-MS polyatomare Masseninterferenzen, die den Nachweis bestimmter Elemente einschränken und zusätzliche Schritte zur Abschwächung erfordern (z. B. Verwendung einer Reaktions- oder Kollisionszelle). Im Allgemeinen können die für ICP-OES und ICP-MS verwendeten flüssigkeitschromatographischen Standard-Probenzufuhrsysteme für die Kopplung an die AF4 oder die CF3 verwendet werden; die Flüssigkeitsflussrate sollte für die Kompatibilität mit dem Detektor entsprechend den Empfehlungen des Herstellers eingestellt werden.

Für die Online-AF4-gekoppelte Quantifizierung von elementarem Kohlenstoff mittels ICP-MS mit einer Helium-Kollisionszelle oder einem TOC-Analysator, der für die Verwendung mit flüssigkeitschromatographischen Systemen ausgelegt ist, wurden Nachweisgrenzen im einstelligen mg/l-Bereich erzielt [50], was den Nachweis und die Quantifizierung von kohlenstoffbasierten Nanoobjekte und anderen kohlenstoffhaltigen Spezies mit einem AF4-basierten Kombinationsverfahren ermöglicht.

Für quantitative Ergebnisse erfordert jede dieser Methoden eine Kalibrierung, vorzugsweise mit rückführbaren analytischen Standards oder zertifizierten Referenzmaterialien. Bei ICP-OES und ICP-MS erfolgt die Kalibrierung durch Injektion von Standardlösungen, die Elemente (oder Massenisotope) von Interesse enthalten, unter Verwendung eines Injektionsventils, das zwischen dem letzten Online-Durchflussdetektor oder dem Ausgangsanschluss des Fraktionierungskanals, wenn keine anderen Detektoren verwendet werden, und der Probenzerstäuber-Schnittstelle direkt vor dem Plasma angeordnet wird. Bei der UV-Vis-Kalibrierung werden Suspensionen mit bekannten Massenkonzentrationen des Analyten in den Fraktionierungskanal injiziert. Bei AF4 sollte für Kalibrierzwecke eine Elution ohne Querfluss verwendet werden.

Die Signalintensität hängt von der Menge der injizierten Probe ab. Die Detektorempfindlichkeit muss so eingestellt werden, dass eine hohe Signalintensität für den Analyten erhalten wird, um eine genaue Datenverarbeitung sicherzustellen. Zum Beispiel absorbieren Proteine und Lipide stark im UV-Bereich und sind im Allgemeinen weniger von Streuung betroffen. Die lineare Beziehung zwischen der gelösten Konzentration und der Peak-Höhe (oder -fläche) muss aufrechterhalten werden, indem die Empfindlichkeit auf derselben Einstellung gehalten wird.

Beim Nachweis mittels UV-Vis kann die gemessene Absorption durch Partikelstreuung beeinflusst werden, die mit der 6. Potenz des Radius (bei einer gegebenen Wellenlänge) zunimmt. Dadurch ist es möglich, dass das UV-Vis-Signal aufgrund von Streuung nicht proportional zur Massenkonzentration ist. Der Streueffekt kann hinreichend unbedeutend sein, um diese Nichtlinearität zu vernachlässigen (z. B. bei Metallpartikeln, die eine starke Oberflächenplasmon-Resonanz (SPR) aufweisen, UV-Absorption durch organische Analyten). Im Allgemeinen sollte eine Korrektur des Streulichtbeitrags angewendet werden, sofern dies möglich oder praktisch durchführbar ist, oder es muss nachgewiesen werden, dass der Streu(licht)beitrag bei der interessierenden Wellenlänge hinreichend vernachlässigbar ist. Der Einfluss des Streulichts kann nach der Fraktionierung stärker ausgeprägt sein im Vergleich zu Batch-Messungen aufgrund der Durchschnittsbildung der Grundgesamtheiten in letzteren.

8.3.3 Anzahlbasierte Verfahren

Auf der Anzahl der Partikel basierende Online-Verfahren zur Konzentrationsmessung in Verbindung mit FFF sind in der Literatur selten beschrieben worden, werden aber in Zukunft wahrscheinlich zunehmen. Aus diesem Grund werden sie hier kurz erwähnt, wobei anerkannt wird, dass es sich hierbei um aufkommende Verfahren handelt, die auf relativ neuen Messtechnologien basieren. Zwei Techniken wurden als Online-Partikelzähldetektoren in Verbindung mit FFF beschrieben, nämlich die Einzelpartikel-ICP-MS (spICP-MS) [53] und die Partikel-Tracking-Analyse (PTA) [52] [54]. Jede hat bestimmte Einschränkungen und Vorteile.

Im Allgemeinen ist die spICP-MS (ICP-MS, die im zeitaufgelösten Modus mit Verweilzeiten von 10 ms oder weniger betrieben wird) für Partikelmassenkonzentrationen im ng/l-Bereich (idealerweise im Bereich von etwa 10^6 bis 10^8 Partikel/l) und für Partikeldurchmesser über etwa 20 nm (abhängig vom erfassten Element) anwendbar. Die Kopplung der spICP-MS an die AF4 oder die CF3 ist im Wesentlichen die gleiche, die für ICP-MS verwendet wird. Allerdings ist das Kalibrierverfahren komplizierter, da die Effizienz des Partikeltransports in das Plasma genau bestimmt und eine Ereignis-Partikelmasse-zu-Größe-Umwandlung durchgeführt werden

muss. Dies erfordert eine zweistufige Kalibrierung, die in der Regel Standardionenlösungen des betreffenden Elements und eine Referenz-Nanopartikelsuspension mit bekannter Partikelgröße und Massenkonzentration einbezieht. Da die Analyse den Transport der Partikel durch den FFF-Kanal beinhaltet, ist es ebenfalls erforderlich, die anzahlbasierte Wiederfindung (mit und ohne angelegtes Feld) für die Analytpartikel zu bestimmen.

PTA ist eine Partikelzähltechnik, die eine optisch-basierte Verfolgung und Detektion verwendet. Obwohl die PTA online an den Auslass der AF4 oder der CF3 gekoppelt werden kann, wird sie in einem Stop-Flow-Modus oder mit extrem niedrigen Flussraten betrieben, die mit der Partikel-Tracking-Technologie kompatibel sind. Die Ergebnisse jedes Analyseintervalls (die die Anzahlkonzentration und die anzahlbasierte hydrodynamische Größe ergeben) können dann gegen die Retentionszeit aufgetragen und integriert werden, um die Gesamtpartikelkonzentration für das Fraktogramm zu erhalten. In der Theorie ist eine Kalibrierung nicht notwendig, um die Partikelkonzentration oder -größe zu erhalten, allerdings gibt es andere Mess- und Materialfaktoren, die die Ergebnisse der Analyse beeinflussen können. Darüber hinaus erfordert die Notwendigkeit eines Stop-Flow- oder Low-Flow-Betriebs ein komplizierteres Kopplungs- und Steuersystem im Vergleich zu spICP-MS, aber PTA kann bei relativ höheren Partikelkonzentrationen (mg/l-Bereich, etwa 10^9 bis 10^{12} Partikel/l) arbeiten, wo die spICP-MS nicht geeignet wäre. PTA ist durch die optischen Streueigenschaften des Materials auf den unteren Partikelgrößenbereich begrenzt; die Partikel müssen ausreichend Licht streuen, damit das System einzelne Partikel (typischerweise > 10 nm) erfassen und verfolgen kann. An der oberen Größengrenze müssen die Partikel ausreichend lange Spuren erzeugen, um eine aussagekräftige Analyse ableiten zu können; da sich die Diffusionsrate mit zunehmender Größe verlangsamt, verringert sich der während der Analyse erfasste Bewegungsbereich.

8.4 Online-Materialidentifizierung oder -zusammensetzung

Zusätzlich zur Messung der Nanoobjektgröße und -konzentration stellt die Messung der Probenzusammensetzung (oder Materialidentifikation) die dritte Hauptart der Online-Analyse bei Anwendung der FFF dar. Im Vergleich zu Messungen der Zusammensetzung im Batch-Modus ergibt die Analyse fraktionierter Proben differenzierte Zusammensetzungsinformationen zu Größe (AF4 und CF3) oder Dichte (CF3).

Die Auswahl eines geeigneten Online-Detektors und Verfahrens hängt von der Art der Probe, der Art der erforderlichen Informationen und der Verfügbarkeit des Detektors ab. Die UV-Vis-Absorption (unter Verwendung bestimmter Wellenlängen oder eines DAD) ist ein wirtschaftlicher Ansatz, der gut funktioniert, wenn die Materialidentifizierung das Hauptziel ist. In diesem Fall können optisch aktive Nanoobjekte anhand ihrer charakteristischen Absorptions-Peaks identifiziert werden. Zum Beispiel können Gold-Nanostäbchen und sphärische Nanopartikel mit ähnlichem Durchmesser fraktioniert und identifiziert werden, indem die bekannten längsgerichteten und querlaufenden Oberflächenplasmonen-Resonanzbänder überwacht werden. Die UV-Vis-Absorption kann auch online zur Unterscheidung zwischen den Zielanalyten (Nanoobjekten) und anderen Spezies (z. B. Mizellen, organische Kolloide) verwendet werden. Um UV-Vis als Detektor zur Materialidentifikation zu verwenden, sind im Allgemeinen einige Vorkenntnisse über die Probe erforderlich, da die Absorption nicht elementspezifisch ist. UV-Vis wird häufig qualitativ verwendet, um das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer betreffenden Spezies zu bestätigen.

Ein Online-Fluoreszenzdetektor kann verwendet werden, um fraktionierte Analytenspezies zu identifizieren, wenn die betreffenden Spezies native Fluorophore sind oder mit fluoreszierenden Markern gekennzeichnet werden können. Die Fluoreszenz bietet eine höhere Spezifität und niedrigere Nachweisgrenzen (häufig vergleichbar mit der Massenspektrometrie) im Vergleich zur UV-Vis-Absorption, ist jedoch in ihrer Anwendung für die Analyse von Nanoobjekten eingeschränkter. Die Fluoreszenzempfindlichkeit wird durch die Intensität des Anregungslichts, die Quanteneffizienz des Fluorophors, die Sättigung (außerhalb des linearen Bereichs) und das Quenchen begrenzt. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen müssen bestimmt oder von vornherein bekannt sein, um dieses Verfahren anwenden zu können; das Verfahren sollte auch mögliche Interferenzen durch andere vorhandene Fluorophore berücksichtigen.

Für die Elementzusammensetzung und Materialidentifizierung bieten ICP-MS und ICP-OES die höchste Spezifität und die niedrigsten Nachweisgrenzen. ICP-OES mit simultaner Multielement-Spurenanalyse ist umfassend anwendbar für die Analyse von komplexen oder natürlichen Nanoobjekten. ICP-MS ermöglicht die Ultraspu-renanalyse spezifischer Elementisotope. In der Vergangenheit wurde keines der beiden Verfahren zur Quantifizierung der wichtigen leichten Elemente Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff verwendet, und beide Verfahren

weisen spektrale oder isotopische Störungen auf, die den Nachweis bestimmter Elemente einschränken. Der Nachweis von Kohlenstoffisotopen mit der ICP-MS mit einer Helium-Kollisionszelle oder des Gesamtkohlenstoffgehalts mit einem TOC-Analysator (der eine Oxidation zu CO₂ mit Nachweis mittels Infrarot erfordert) haben sich in Kombination mit der AF4, wie zuvor erwähnt, in als erfolgreich erwiesen. Die Fähigkeit, Kohlenstoff im einstelligen mg/l-Bereich nachzuweisen, stellt eine wichtige und zunehmende Anwendung für FFF-basierte Verfahren dar, obwohl eine Reihe von technischen Fragestellungen (z. B. kohlenstoffreiche Hintergründe, anorganischer Kohlenstoff und Matrixeffekte) ihre Anwendung einschränken oder erschweren können.

8.5 Offline-Analyse (Fraktionssammlung)

Fraktionen können nach der Trennung durch AF4 oder CF3 gesammelt und für die Offline-Analyse verwendet werden. Der Vorteil der Fraktionssammlung ist ein größerer Bereich verfügbarer Nachweisverfahren im Vergleich zur Online-Detektion. Die Fraktionen können mit einem automatischen Fraktionssammler oder durch manuelles Sammeln anhand festgelegter Elutionszeitintervalle gesammelt werden. Offline-Ergebnisse können dann mit der Retentionszeit abgeglichen werden, die von einem geeigneten Online-Detektor (typischerweise UV-Vis oder MALS) nachgewiesen wird; in diesem Fall reicht eine einzige Ansprechwellenlänge oder ein einziger Streuwinkel aus, um die Elution zu überwachen.

Die Offline-Analyse umfasst eine große Vielfalt möglicher Verfahren und wird nur durch das Volumen und die Konzentration des nach der Fraktionierung vorliegenden Analyten beschränkt. Die Menge (d. h. das Volumen der gesammelten Fraktion) kann erhöht werden, sofern erforderlich, indem Fraktionen aus mehreren unter identischen Bedingungen durchgeführten Versuchen kombiniert werden. Die Konzentration des Analyten kann durch Zentrifugation oder Filtration kombinierter Fraktionen erhöht werden, sofern erforderlich.

Die gebräuchlichsten Offline-Analyseverfahren sind wie folgt:

- a) Elektronenmikroskopie (Transmissions- oder Rasterelektronenmikroskopie) zur Abbildung fraktionierter Nanoobjekte und zur Messung oder Bestätigung physikalischer Dimensionen; erfordert die Abscheidung von Material aus der Fraktion auf ein geeignetes Substrat, gefolgt von der Entfernung der restlichen mobilen Phase. Alternativ kann Kryo-TEM zur Abbildung bestimmter weicher Materialien eingesetzt werden, die nach einem herkömmlichen Abscheidungsverfahren nicht unversehrt bleiben würden. Umwelt-Elektronenmikroskope mit speziellen Zellauslegungen können die Analyse von Proben unter einer gasregelten Umgebung und in einer flüssigen Phase ermöglichen; die Vergrößerung oder Auflösung bei diesen Messgeräten ist im Allgemeinen jedoch reduziert im Vergleich zu denen, die im Vakuum betrieben werden. Ein Mikroskop, das mit einem energiedispersiven Spektrometer ausgestattet ist, kann auch semi-quantitative oder qualitative Informationen über die Elementzusammensetzung von Proben liefern.
- b) Rasterkraftmikroskopie zur Abbildung oder Messung der Höhenverschiebung von fraktionierten Nanoobjekten nach der Abscheidung auf ein geeignetes Substrat; die Messungen können nach Entfernung der mobilen Phase (trocken) oder in Anwesenheit der mobilen Phase mit Hilfe einer Flüssigkeitszelle durchgeführt werden.
- c) Einzelpartikel-ICP-MS zur Messung der Masse (oder massebasierten Größe) einzelner Nanoobjekte und ihrer Anzahlkonzentration innerhalb jeder Fraktion.
- d) ICP-MS und ICP-OES zur Messung der Konzentration und elementaren Zusammensetzung fraktionierter Nanoobjekte; dies erfordert üblicherweise keinen vorhergehenden Aufschluss, die Ergebnisse können jedoch durch Auflösung in einem stabilen sauren Medium verbessert werden.
- e) UV-Vis-NIR zur Charakterisierung der optischen Absorptionseigenschaften fraktionierter Nanoobjekte; die Offline-Messung bietet allgemein einen breiteren Wellenlängenbereich im Vergleich zu Online-Detektoren.

8.6 Alternative und aufkommende Verfahren

Die Kopplung von AF4 mit ICP-TOFMS (Flugzeitmassenspektrometrie) bietet nachweislich mögliche Vorteile für die Multi-Element-Analyse komplexer anorganischer Partikel, sowohl in herkömmlichen Modi als auch in